

**Die Bedeutung von Jun-Proto-Onkogenen in der
Pathogenese der rheumatoiden Arthritis**

**Analyse der Genexpression, Detektion von Punktmutationen,
Auswirkungen der Jun-Komponenten auf die Funktion des AP-1
Transkriptionsfaktors**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt

**dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Dipl.-Biochem. René Huber

geboren am 04. März 1976

in Stade

Liste der Gutachter

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Wetzker**
Institut für Molekulare Zellbiologie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Drackendorfer Str. 1
07747 Jena
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Raimund W. Kinne**
AG Experimentelle Rheumatologie
Lehrstuhl für Orthopädie der
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“
Klosterlausnitzer Str. 81
07607 Eisenberg
- 3. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Wölfl**
Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie
Abteilung Biologie
Ruprecht-Karls-Universität
Im Neuenheimer Feld 364
69120 Heidelberg

Datum der mündlichen Prüfung: 16. Mai 2006

Datum der öffentlichen Verteidigung: 03. Juli 2006

I. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ACR	<i>engl.</i> American College of Rheumatism
AK	Antikörper
Ala oder A	Alanin
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	<i>engl.</i> activator protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	AU-reiches Element
Arg oder R	Arginin
AS	Aminosäure
ATF	<i>engl.</i> activating transcription factor
ATP	Adenosintriphosphat
AUF	<i>engl.</i> AU-rich element binding factor
BCA	<i>engl.</i> Bicinchoninic acid
Bp	Basenpaare
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
C	Cytosin
c	Konzentration
C/EBP	<i>engl.</i> CAAT enhancer binding protein
CD	<i>engl.</i> Cluster of differentiation
cDNA	<i>engl.</i> copy-DNA
CFTR	<i>engl.</i> cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CRE	<i>engl.</i> cAMP-responsive element
CRP	C-reaktives Protein
d	desoxy
DAPI	4'-6 Diamidino-2-phenylindol
ddNTP	Didesoxyribonukleotid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DMEM	<i>engl.</i> Dulbecco's modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	<i>engl.</i> double-stranded

DTT	Dithiotreitol
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Egr	<i>engl.</i> early growth response factor
ELAV	<i>engl.</i> embryonic lethal abnormal vision
ELISA	<i>engl.</i> enzyme-linked immuno sorbent assay
ERK	<i>engl.</i> extracellular signal-regulated kinase
Ets	<i>engl.</i> E26 transformation-specific
FACS	<i>engl.</i> fluorescence-activated cell-sorting
FCRL	<i>engl.</i> Fc-receptor like family member
FCS	Fötales Kälberserum
FosK	Fos-Kinase
Fra	<i>engl.</i> Fos-related antigen
G	Guanin
G0S	<i>engl.</i> G0/G1 switch regulator gene
GAPDH	Glyceraldehyd-3-dehydrogenase
GATA	<i>engl.</i> GATA consensus sequence binding protein
GH	<i>engl.</i> growth hormon
Gln oder Q	Glutamin
Grb	<i>engl.</i> growth factor receptor binding protein (Grb-2)
GT	Gelenktrauma
HEPES	4-2-Hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonsäure
HLA	<i>engl.</i> human leukocyte antigen
hnRNP	<i>engl.</i> heterogeneous nuclear ribonucleic particle
hPABP	humanes Poly-A-bindendes Protein
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
Hu	<i>engl.</i> human antigen
HWZ	Halbwertszeit
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IR	<i>engl.</i> inverted repeat
JDP	<i>engl.</i> Jun dimerization partner
JNK	<i>engl.</i> Jun N-terminal kinase

LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
log	Logarithmus
Lys oder K	Lysin
Mφ	Makrophagen
Maf	<i>engl.</i> musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene
MAPK	<i>engl.</i> mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK- oder ERK-Kinase
MEKK	MEK-Kinase
MHC	<i>engl.</i> major histocompatibility complex
MKK	MAPK-Kinase
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>engl.</i> messenger RNA
NFκB	<i>engl.</i> nuclear factor κB
NF-1	<i>engl.</i> nuclear factor 1
NGF	<i>engl.</i> nerve growth factor
NIRCA	<i>engl.</i> Non-Isotopic RNase Cleavage Assay
NK	Normalkontrolle
Nup	<i>engl.</i> nuclear protein
OA	Osteoarthrose
Oct	Octanukleotid-Sequenz
OD	Optische Dichte
OTF-1	<i>engl.</i> Octamer transcription factor 1
p90RSK	Serin/Threonin-Kinase p90RSK.
PADI	<i>engl.</i> peptidylarginine deiminase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>engl.</i> Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>engl.</i> Platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-myristoyl-13-azetat
RA	rheumatoide Arthritis
Raf	MEKK-/MEK-aktivierende Protein-Kinase Raf
Ras	kleines GTP-bindendes Protein Ras („rat sarcoma“)

rcf	<i>engl.</i> relative centrifugal force
RNA	Ribonukleinsäure
rNTP	Ribonukleotidtriphosphat
rpm	<i>engl.</i> rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur bzw. reverse Transkription
RUNX	<i>engl.</i> runt-related transcription factor
SAPK	<i>engl.</i> stress-activated protein kinase
SCID	<i>engl.</i> Severe combined immunodeficiency
SDS	<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate
SEM	<i>engl.</i> standard error of the mean
Ser oder S	Serin
SFB	synoviale Fibroblasten
Shc	<i>engl.</i> src-homology-2 (SH-2) domain containing protein
SLC22A	<i>engl.</i> solute carrier family 22 member
SM	Synovialmembran
SNP	<i>engl.</i> single nucleotide polymorphism
Sos	Guaninnukleotid-Austauschfaktor für Ras („son-of-sevenless“)
SP1	<i>engl.</i> specificity protein 1
SRE	<i>engl.</i> serum response element
SRF	<i>engl.</i> serum response factor
ss	<i>engl.</i> single-stranded
SSC	NaCl-Natriumcitrat-Puffer
STAT	<i>engl.</i> signal transducer and activator of transcription
T	Thymin
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TBS	Tris-buffered saline
TBS/T	TBS mit 0,1 % Triton
TCF	<i>engl.</i> ternary complex factor
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TF IID	Transkriptionsfaktor IID
TGF	<i>engl.</i> transforming growth factor
TIMP	<i>engl.</i> tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases
TIS	<i>engl.</i> TPA-induced sequence
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	TNF-Rezeptor

TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-azetat
TRE	<i>engl.</i> TPA response element
TRH	<i>engl.</i> thyrotropin-releasing hormone
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminoethan
TTP	Tristetraprolin
U	Uridin
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>engl.</i> vascular endothelial growth factor
wt	Wildtyp
ZFP	Zink-Finger-Protein

II. Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische, entzündlich-rheumatische Erkrankung. Zu ihren charakteristischen Merkmalen gehören – neben der Entzündung – die Hyperplasie der Synovialmembran (SM) und die Zerstörung der betroffenen Gelenke. Für die Entwicklung der RA und die entzündliche Veränderung der SM spielen synoviale Fibroblasten eine wichtige Rolle, da sie u. a. durch die Sekretion von Matrixmetalloproteinasen an verschiedenen pro-inflammatorischen und pro-destruktiven Prozessen beteiligt sind. Diese Proteinasen und eine Reihe weiterer pro-inflammatorischer Mediatoren werden maßgeblich über den Transkriptionsfaktor AP-1 reguliert, der in der RA eine entscheidende pathogenetische Rolle spielt. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Bedeutung der AP-1-Untereinheiten cjun, junB, junD und cfos in der RA-SM durchgeführt. Dazu gehören die Analyse der mRNA- und Proteinexpression der jun- und fos-Gene und der Einfluß mRNA-stabilitätsmodifizierender Proteine auf die jun- und fos-mRNA-Menge. Außerdem wurde das Auftreten von Mutationen in den Promotoren und codierenden Regionen der jun- und fos-Gene untersucht. Anschließend wurde eine Analyse der Allelfrequenzen einiger bekannter sowie neu identifizierter Mutationen/SNPs in der SM von Patienten mit RA durchgeführt. Als Kontrollgruppen dienten bei diesen Untersuchungen Proben von Osteoarthritis- (OA) und Gelenktrauma-Patienten (GT; Entzündungskontrolle), bzw. post mortem gewonnene Normalproben.

Die durchgeführten Expressionsanalysen zeigen, daß die jun- und fos-mRNA in der RA nur in geringen, den normalen Kontrollen entsprechenden Mengen exprimiert werden. Dies steht im deutlichen Widerspruch zu einem großen Teil der Literaturdaten. Die Jun- und Fos-Proteine werden in der RA hingegen in deutlich höheren Mengen synthetisiert als in NK- oder GT-Proben. Damit liegt eine auffällige Diskrepanz zwischen der mRNA- und Proteinexpression in der RA vor, die bisher nur vom Tumorsuppressor Maspin bekannt war.

Eine Ursache für diese Diskrepanz könnte eine veränderte Expression der mRNA-stabilitätsmodifizierenden Proteine sein, die die Halbwertszeit der jun- und fos-mRNA regulieren. Tatsächlich wird das mRNA-destabilisierende Protein TTP in der RA leicht erhöht exprimiert und könnte daher zum Abbau eines Teils der gebildeten mRNA-Stränge und somit zur geringen jun- und fos-mRNA-Menge beitragen. Das mRNA-stabilisierende Protein HuR ist dagegen in der RA stark erhöht exprimiert und könnte deshalb die verbleibenden Stränge stabilisieren und somit zu einer Verlängerung der Translationsdauer führen. Interessanterweise zeigen auch die mRNA-stabilitätsmodifizierenden Proteine selbst eine

Diskrepanz zwischen ihrer mRNA- und Proteinexpression, ein möglicher Hinweis auf eine umfassende Störung der Kopplung von Transkription und Translation in der RA-SM.

Ein weiterer Faktor, der wahrscheinlich zur geringen mRNA-Expression der jun- und fos-Gene in der RA-SM beiträgt, ist das Auftreten einer Reihe von Mutationen und SNPs in den Promotoren von cjun, junB und cfos. Diese Mutationen/SNPs reduzieren in Reporterassays die Transkription der von den entsprechenden Promotoren abhängigen Gene um bis zu 90%, wobei dieser Effekt nicht nur bei der basalen Transkription, sondern auch unter Stimulation zu beobachten ist. Durch den Nachweis dieser Mutationen/SNPs in der SM und im Blut der betroffenen Patienten konnte gezeigt werden, daß es sich um Keimbahn-Mutationen/SNPs handelt. Diese Mutationen/SNPs könnten also zu einer genetischen Prädisposition für die RA beitragen.

Die Tatsache, daß sich trotz einer geringen mRNA-Menge eine unerwartet hohe Proteinexpression nachweisen läßt, könnte durch eine Umstellung der jun-/fos-Expression von einer regulierten zu einer konstitutiven Expression erklärt werden, wie sie in der RA bereits beschrieben wurde. Diese konstitutive Expression könnte durch eine geringe, aber konstant vorhandene mRNA-Menge zur erhöhten Jun-/Fos-Proteinexpression beitragen.

Bei der funktionellen Analyse des cjun-Promotors trat ein weiterer unerwarteter Befund auf: es konnte gezeigt werden, daß der bisher in der Literatur beschriebene cjun-Kern-Promotor nicht zur Initiation der Transkription in der Lage ist, wenn ihm große Teile der nachfolgenden 5'-UTR fehlen, während die 5'-UTR auch ohne die Anwesenheit des Kern-Promotors eine nachweisbare Genexpression initiieren kann. Hinzu kommt, daß die meisten der funktionell aktiven Mutationen/SNPs in der 5'-UTR der jun- und fos-Gene lokalisiert sind. Dies deutet darauf hin, daß die 5'-UTR bei der Expression der jun- und fos-Gene von größerer Bedeutung ist, als bisher angenommen wird und soll die Grundlage für detaillierte Untersuchungen in der Zukunft bilden.

Ausgehend von den bekannten bzw. neu identifizierten Mutationen/SNPs in den Promotoren und den codierenden Regionen der jun- und fos-Gene wurde ein DNA-Microarray zur Detektion dieser Mutationen/SNPs entwickelt und erfolgreich optimiert. Damit soll die Analyse einer großen Probenzahl und damit die Identifikation von Assoziationen bestimmter Mutationen/SNPs mit der Suszeptibilität der Patienten für die RA ermöglicht werden. Mit diesem innovativen Werkzeug konnten bereits insgesamt 6 Mutationen/SNPs in einer Gesamtzahl von 25 Patienten/Spendern erfolgreich analysiert werden. Aufgrund verbleibender technischer Probleme bei einigen Mutationen, die momentan durch weitere

Optimierungsschritte beseitigt werden, war jedoch noch keine komplette Analyse aller Patientenproben möglich. Die bisherigen Ergebnisse zeigen allerdings, daß die Unterschiede zwischen den Allelfrequenzen der Mutationen/SNPs in den verschiedenen Patienten- und Kontrollgruppen sehr gering sind und deshalb bis zu 500 Patienten pro Gruppe untersucht werden müssen, um statistisch valide Ergebnisse zu erzielen. Die Planung von zukünftigen Assoziationsstudien wird durch diese Informationen deutlich erleichtert und die Erweiterung der bisher bestehenden Probensammlung von jeweils 200 Proben pro Gruppe wird nun intensiv vorangetrieben.

Insgesamt konnte eine Störung der Kopplung zwischen Transkription und Translation sowie eine Verschiebung des Expressionsmusters der jun- und fos-Gene in der RA identifiziert werden, die wahrscheinlich vom Auftreten funktioneller Mutationen/SNPs in den Promotoren dieser Gene bzw. von mRNA-stabilitätsmodifizierenden Proteinen beeinflusst wird und in einer pathologisch veränderten AP-1-Funktion in der RA resultiert.

III. Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis

II. Zusammenfassung

III. Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Die rheumatoide Arthritis.....	1
1.2	Die Bedeutung der Synovialmembran für die Pathogenese der RA.....	3
1.3	Die Bedeutung der SFB für die Pathogenese der RA.....	4
1.4	Der Transkriptionsfaktor AP-1.....	6
1.5	Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP-1.....	9
1.5.1	Biologische Eigenschaften von cJun und cFos.....	13
1.5.2	Biologische Eigenschaften von JunB.....	13
1.5.3	Biologische Eigenschaften von JunD.....	14
1.5.4	Weitere strukturverwandte Dimerisierungspartner und Kooperation mit weiteren Transkriptionsfaktoren.....	15
1.6	Post-transkriptionale Regulation in Abhängigkeit von verschiedenen mRNA-stabilitätsmodifizierenden Proteinen.....	16
1.7	Der Einfluß von Mutationen und Polymorphismen in relevanten Genen auf die Pathogenese der RA.....	17
1.8	Assoziation von Mutationen/SNPs mit Erkrankungen.....	19
1.9	Rolle der Chip-basierten Mutationsanalysen für Assoziationsstudien zur Identifikation genetischer Marker.....	21
1.10	Ziele der Arbeit.....	23
2.	Material und Methoden.....	25
2.1	Material.....	25
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	25
2.1.2	Liste der eingesetzten Antikörper.....	25
2.1.3	Liste der eingesetzten Software-Programme.....	25
2.1.4	Zusammensetzung der eingesetzten Lösungen und Medien.....	26
2.1.5	Patienten und Gewebeproben.....	26
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Isolation und Charakterisierung primärer SFB und Mφ.....	27
2.2.2	RNA- und DNA-Isolierung.....	28
2.2.2.1	RNA-Isolierung aus SM-Gewebe mittels RNeasy Mini Kit.....	28
2.2.2.2	Kontrolle der RNA-Qualität	28
2.2.2.3	Synthese von cDNA mittels reverser Transkription.....	29
2.2.2.4	DNA-Isolierung aus SM-Gewebe mittels QIAamp Mini Kit.....	30

2.2.3	Klonierung.....	30
2.2.3.1	Herstellung von Plasmidkonstrukten zur Transformation.....	30
2.2.3.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	31
2.2.3.3	Transformation der <i>E. coli</i> -Zellen.....	31
2.2.3.4	Plasmidisolierung mit der „Miniscreen“-Methode nach Birnboim und Doly.....	32
2.2.3.5	Spaltung der isolierten Plasmide mittels Restriktionsendonukleasen.....	32
2.2.3.6	Plasmidisolierung mittels Nucleobond PC 100 Kit.....	32
2.2.3.7	Plasmidisolierung mittels Nucleospin Plus Kit.....	32
2.2.3.8	Endotoxinfreie Plasmidisolierung mit dem NucleoBond PC 500 EF Kit.....	33
2.2.3.9	Fällung der Plasmide.....	33
2.2.4	Präparation von Kern- und Zellextrakten.....	33
2.2.5	Die konventionelle Polymerase-Ketten-Reaktion.....	34
2.2.5.1	Konventionelle PCR.....	34
2.2.5.2	Reinigung von PCR-Produkten mittels QIAquick Purification Kit.....	34
2.2.6	Die „real-time“ Polymerase-Ketten-Reaktion.....	35
2.2.6.1	„Real-time“ PCR.....	35
2.2.6.2	Normalisierung der mRNA-Konzentration in den einzelnen Proben mittels „real-time“ RT-PCR.....	36
2.2.7	Herstellung der externen Standards und der Standardkurven.....	36
2.2.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot.....	37
2.2.8.1	Bestimmung der AUF-1-, TTP- und HuR-Proteinexpression mittels Western-Blot.....	37
2.2.9	Enzyme-linked immuno-sorbent assay.....	38
2.2.9.1	Bestimmung der <i>Jun</i> - und <i>Fos</i> -Proteinexpression mittels ELISA.....	38
2.2.10	Immunhistologie.....	39
2.2.11	Der Non-Isotopic RNase Cleavage Assay.....	39
2.2.11.1	Detektion von Mutationen mittels MutationScreener.....	40
2.2.11.2	Identifikation der Position der identifizierten Mutationen/SNPs.....	41
2.2.12	Das Pyrosequencing.....	41
2.2.12.1	Pyrosequencing DNA-Proben aus SM-Gewebe.....	42
2.2.13	Der DNA-Microarray zur Analyse von Mutationen/SNPs mit einer potentiellen Assoziation zu rheumatischen Erkrankungen.....	43
2.2.13.1	Optimierung und Validierung des DNA-Microarrays.....	44
2.2.13.2	Anwendung des DNA-Microarrays.....	45
2.2.14	Funktionelle Analyse von Promotor-Mutationen/SNPs.....	46
2.2.14.1	Transfektion von NIH-3T3-Zellen mittels Polyfect Transfection Reagent.....	46
2.2.14.2	Lumineszenzmessung.....	47
2.2.15	Agarose-Gelelektrophorese.....	47
2.2.16	Sequenzierung.....	48
2.2.17	Statistische Analyse und <i>in silico</i> -Analysen.....	49

3.	Ergebnisse.....	50
3.1	Analyse der mRNA-Qualität.....	50
3.2	Quantifizierung der jun und fos mRNA- und Proteinexpression.....	51
3.2.1	Quantifizierung der jun- und fos-mRNA-Expression in der SM	51
3.2.2	Quantifizierung der jun- und fos-mRNA-Expression in isolierten Zellpopulationen.....	52
3.2.3	Quantifizierung der Jun- und Fos-Proteinexpression in der SM.....	54
3.2.4	Immunhistochemische Detektion der cFos- und JunB-Proteinexpression.....	55
3.2.5	Korrelationsanalysen.....	57
3.3	Quantifizierung der mRNA- und Proteinexpression von stabilitätsmodifizierenden Proteinen.....	59
3.3.1	Quantifizierung der AUF-, TTP- und HuR-mRNA-Expression in der SM	59
3.3.2	Quantifizierung der AUF-1-, TTP- und HuR-Proteinexpression in der SM.....	59
3.4	NIRCA-basierte Mutationsanalyse der codierenden Region von junB und junD in der SM.....	61
3.4.1	NIRCA-basierte Mutationsanalyse der codierenden Region des Gens junB.....	61
3.4.2	NIRCA-basierte Mutationsanalyse der codierenden Region des Gens junD.....	61
3.5	NIRCA-basierte Mutationsanalyse der Promotorregionen der jun- und fos-Gene.....	61
3.5.1	NIRCA-basierte Mutationsanalyse der Promotorregion der Gene <i>cjun</i> , <i>junB</i> , <i>junD</i> und <i>cfos</i> in der RA-SM.....	61
3.5.2	Analyse der identifizierten Mutationen im Blut und in SFB.....	63
3.6	Funktionelle Analysen.....	64
3.6.1	Reportergen-Expression in Abhängigkeit vom vorgeschalteten Promotor (unstimulierte Zellen).....	64
3.6.2	Reportergen-Expression in Abhängigkeit vom vorgeschalteten Promotor (Stimulierung der Zellen mit PMA).....	65
3.7	Analyse von Mutationen und SNPs mittels DNA-Microarray.....	67
3.7.1	Optimierung und Validierung des DNA-Microarrays.....	67
3.7.2	Häufigkeit der analysierten Mutationen/SNPs in NK-, OA- und RA-Proben	70
3.8	Pyrosequencing.....	74
3.8.1	Validierung des Pyrosequencings.....	74
3.8.2	Pyrosequencing der codierenden Regionen und der Promotoren von <i>cjun</i> und <i>cfos</i>	74
3.9	In silico Analysen.....	79
4.	Diskussion.....	82
4.1	Analyse der jun- und fos-Genexpression.....	82
4.1.1	Analyse der jun- und fos-mRNA-Expression.....	82
4.1.2	Analyse der Jun- und Fos-Proteinexpression.....	84
4.1.3	Die Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinexpression.....	86
4.1.4	Der Einfluß mRNA-stabilitätsmodifizierender Proteine auf die Diskrepanz.....	87

4.2	Mutationen/SNPs in den Promotoren der jun- und fos-Gene.....	88
4.2.1	Art und Häufigkeit der Mutationen/SNPs in den jun-/fos-Promotoren	90
4.2.2	Einfluß der identifizierten Mutationen/SNPs auf die Genexpression.....	91
4.2.3	Bedeutung der Mutationen/SNPs für die Pathogenese der RA.....	94
4.3	Mutationen in den codierenden Regionen der jun- und fos-Gene.....	94
4.4	Entwicklung eines DNA-Microarrays zur Detektion von Mutationen/SNPs.....	95
4.4.1	Design des DNA-Microarrays.....	95
4.4.2	Optimierung und Validierung des DBA-Microarrays.....	96
4.4.3	Einsatz des DNA-Microarrays.....	96
4.5	Bedeutung der Ergebnisse für die Planung von Assoziationsstudien.....	98
4.6	Schlußfolgerungen und Ausblick.....	99
	Literaturverzeichnis.....	i
Anhang	xxiii
Anhang A	Anhang zu Material und Methoden.....	xxiv
Anhang B:	Anhang zu den Ergebnissen.....	xlvi
Danksagung.....		xlvi
Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang.....		xlvi
Publikationsverzeichnis.....		xlvi
Selbständigkeitserklärung.....		li
Erklärung zur Dissertation.....		lii

1. Einleitung

1.1 Die rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA), auch chronische Polyarthritits genannt, ist eine rheumatische Erkrankung, deren Erscheinungsbild durch Entzündung, synoviale Hyperplasie und Zerstörung der betroffenen Gelenke bestimmt wird (1). Kennzeichnend für die RA ist eine initiale, entzündliche Veränderung der Synovialmembran (Gelenkinnenhaut, SM). Eine primäre Dysregulation des Knorpelstoffwechsels, wie sie bei der degenerativen rheumatischen Erkrankung Osteoarthritis (OA) vermutet wird, scheint hingegen bei der Pathogenese der RA keine Rolle zu spielen. In den Industriestaaten sind nach bisherigen Daten zwischen 0,5-4% der Bevölkerung von der RA betroffen. Studien neueren Datums, welche die Erfüllung der Klassifikationskriterien positiver Rheumafaktor sowie radiologisch nachweisbare Gelenkveränderungen voraussetzen, reduzieren diesen Prozentsatz allerdings auf 0,15-0,6% (2). Die RA entwickelt sich in ihrem Verlauf zu einer chronischen und systemischen Erkrankung (3), bei der in den meisten Fällen eine typische Abfolge des entzündlichen Befalls der Gelenke zu erkennen ist. Zuerst sind die Handgelenke und die Grund- und Mittelgelenke der Finger betroffen, später auch die Gelenke der unteren Extremitäten, wie die Grundgelenke der Zehen oder die Kniegelenke. Im Verlauf der Erkrankung kann sich die Entzündung auf weitere Gelenke ausdehnen. Durch die fortschreitende Entzündung des Gewebes kommt es (u. a. durch die Abgabe von Zytokinen aus der SM ins Blut) auch zur Ausbildung einer systemischen Komponente. Diese führt z. B. zur vermehrten Synthese von Akutphase-Proteinen in der Leber, wie dem zur Proteinfamilie der Pentraxine gehörenden C-reaktiven Protein (CRP), welches die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) erhöht. Anhand der Bestimmung der BSG des peripheren Blutes kann also eine Aussage über den Grad der systemischen Entzündungskomponente getroffen werden. Der schwere Verlauf der Erkrankung führt zu einer verminderten Lebenserwartung und -qualität, u.a. durch persistierende Beschwerden und eingeschränkte Mobilität. Am Anfang steht Morgensteifigkeit im Vordergrund, im Endstadium tritt Invalidität durch ankylotische Deformation und Destruktion der Gelenke ein (4).

Für die Gelenkdestruktion ist das sogenannte Pannusgewebe verantwortlich (5), das sich aus der Synovialmembran bildet und sich vom Gelenkrezessus bzw. von den Kreuzbänderansätzen über den Gelenkknorpel schiebt. Dieses Gewebe beginnt dann zangenförmig den Knorpel und den darunter liegenden Knochen zu invadieren. Das Pannusgewebe zeigt histologische Ähnlichkeiten mit Granulationsgewebe, es lassen sich jedoch auch Eigenschaften von aggressiv-destruktivem, als „semi-transformiert“ bezeichnetem Bindegewebe beobachten (6).

Bisher sind die pathogenetischen Ursachen für die Entwicklung der RA noch unverstanden (7). Als pathogenetische Grundlagen der RA werden heute auf der einen Seite Autoimmun-Reaktionen bzw. Fehlreaktionen gegen infektiöse Erreger, auf der anderen Seite jedoch auch eine genetische Prädisposition diskutiert. Für eine Autoimmun-Reaktion gegen ein arthritogenes Antigen spricht die Akkumulation von T-Lymphozyten in den betroffenen Gelenken (7) sowie die von B-Lymphozyten lokal sezernierten Immunglobuline (6). Zu den bisher im Rahmen der RA charakterisierten Autoantigenen gehören u. a. das Chondrozytenmembran-Protein CH65, das von Autoantikörpern erkannt wird (8), und das in der SM exprimierte Protein p205. Dieses Protein spielt eigentlich eine (nicht völlig aufgeklärte) Rolle bei der Wachstumskontrolle (9), aktiviert in der RA aber autoreaktive T-Zellen (10;11). Auch die Sekretion von Immunglobulinen, die gegen die konstante Region der körpereigenen IgG-Antikörper (AK) gerichtet sind (sogenannte Rheumafaktoren), wird trotz der mangelnden RA-Spezifität als ein Indiz für die Autoimmun-Pathogenese der RA angesehen. In der RA-SM können darüber hinaus stark erhöhte Spiegel von pro-inflammatorischen Zytokinen nachgewiesen werden. Dabei liegt ein Überschuß von Makrophagen- (Mφ-) typischen Zytokinen [z. B. Interleukin (IL) -1, IL-6, TNF-α] gegenüber den durch T-Zellen sezernierten Zytokinen (z. B. IL-2, IL-4, Interferon γ) vor (12).

Da bisher kein infektiöses Agens aus der RA-SM isoliert werden konnte, ist die These einer infektionsabhängigen Entstehung der RA weit weniger gut zu untermauern. Deshalb wird eher eine Autoimmun-Reaktion als Folge eines Kontaktes mit bakteriellen oder viralen Antigenen wie z.B. Hitzeschockproteinen (Hsp) diskutiert, die zu einer immunologischen Kreuzreaktion mit körpereigenen Antigenen führt (2). Hinweise darauf bieten aus der Synovialflüssigkeit isolierte Immunglobuline und T-Lymphozyten, die gegen das Hsp 65 von *Mycobacterium tuberculosis* gerichtet sind und die eine Kreuzreaktion mit dem stark homologen humanen Hsp 60 zeigen (2). Allerdings konnte ein Vorkommen dieser kreuzreagierenden AK auch bei anderen Erkrankungen rheumatischer Natur bzw. bei an Tuberkulose erkrankten Patienten und sogar bei gesunden Personen nachgewiesen werden (13). Eine Spezifität für die RA ist in diesem Fall also nicht gegeben. Einen weiteren Auslöser für mögliche Kreuzreaktionen könnte die konservierte Aminosäure- (AS) Sequenz QKRAA darstellen, die sich nicht nur in den zum „major histocompatibility complex“ (MHC) gehörenden „human leukocyte antigen“- (HLA) Subtypen findet, sondern auch in bakteriellen Proteinen (Streßprotein Dna J; 14) und viralen Proteinen auftritt (Membranprotein Gp 110 des Epstein-Barr-Virus, 2;15). Wegen ihres ubiquitären Auftretens wird diese AS-Sequenz auch als „shared epitope“ bezeichnet. Die Präsentation eines Peptides bakterieller/viraler Herkunft mit dieser AS-Sequenz durch MHC-II-Moleküle könnte also zu einer Autoimmun-Antwort führen, die diese Sequenz sowohl in Bakterien/Viren als auch in

humanen Proteinen (den HLA-Subtypen) kreuzreaktiv erkennt (16). Gestützt wird diese These durch den Nachweis viraler Proteine in der Synovialflüssigkeit - wie des „latent membrane protein 1“ des Epstein-Barr-Virus (EBV; 17) – und die erfolgreiche Isolierung von EBV-infizierten SFB aus der SM von RA-Patienten (7;18).

Für eine Beteiligung von genetisch prädisponierenden Faktoren an der Entstehung und dem Fortschreiten der RA spricht vor allem die Korrelation zwischen dem Auftreten (und der Schwere) der RA und der Expression bestimmter HLA-Subtypen (2). HLA-Moleküle gehören zum MHC und unterliegen starken Polymorphismen. Sie werden in vier verschiedenen MHC-Haplotyp-Komplexen (A, B, C und D) vererbt, welche wiederum mehrere verschiedene HLA-Allele enthalten, die in verschiedenen HLA-Subtypen exprimiert werden (19). Das für die genetische Determination der RA bedeutsamste Allel ist das HLA-DR4 und seine Subtypen, die an den Aminosäurepositionen 70-74 der dritten hypervariablen Region der HLA-DRB1-Kette ebenfalls über die o. g. „shared-epitope“-Sequenz verfügen. Ein Beispiel für einen solchen HLA-DR4-Subtyp ist HLA-DRB1*0401; es tritt bei RA Patienten auf einem Allel zu 50% und auf dem anderen Allel zu 27% auf, während man es in gesunden Kontrollgruppen nur zu 14% bzw. 7% findet (2). Als weitere mögliche genetische Grundlage der RA gilt ihre Assoziation mit bestimmten Polymorphismen, die sich im TNF- α -Promotor (20) sowie in den regulatorischen Regionen weiterer Gene befinden (siehe 1.8).

Neben den genannten (potentiellen) Faktoren liegt außerdem ein hormoneller Einfluß auf die Entstehung und Entwicklung der RA nahe, da zwei- bis dreimal mehr Frauen von dieser Erkrankung betroffen sind als Männer (2). Dies spiegelt sich in Untersuchungen wider, die im Modell der humanen Eierstock-Follikel-Atresie zeigen konnten (21), daß Östrogene eine anti-apoptotische Wirkung auf Zellen ausüben (22). Dadurch könnte eine Eliminierung von Zellen unterdrückt werden, die während der Entwicklung der RA aktiviert werden und zur Entzündung beitragen, wie z. B. Leukozyten oder synoviale Fibroblasten (SFB; siehe 1.2 und 1.3). Eine Induktion von Apoptose konnte hingegen für Androgene nachgewiesen werden (22).

1.2 Die Bedeutung der Synovialmembran für die Pathogenese der RA

Die SM besteht aus einer ein- bis zweilagigen Deckzellschicht (Intima) - die M ϕ -ähnliche, histiozytäre Zellen (Typ A) und fibroblastäre Zellen (Typ B) enthält - und aus einer Subintima, in der Fibroblasten und Neuronen sowie die Blut- und Lymphgefäße der Membran vorliegen (5;23). In der Subintima läßt sich darüber hinaus eine erhöhte Anzahl von (eingewanderten) T-Zellen und M ϕ nachweisen, die lymphoide Aggregate bzw. diffuse Infiltrate bilden (24-26).

Mit fortschreitender RA entwickelt sich die Deckzellschicht der SM zu einem mehrschichtigen System, welches schließlich bis zu zehn Zellschichten umfassen kann (27).

Die endgültige Ursache für diese Veränderung (Immigration von Mφ oder Proliferation der lokal ansässigen SFB) ist nicht abschließend geklärt. Eine Infiltration von Immunzellen sowie eine verstärkte Angiogenese kann in der Subintima nachgewiesen werden (6). So ist für eine akute Synovitis die Bildung diffuser entzündlicher Infiltrate und lymphoider Aggregate in der Subintima kennzeichnend (27), die in Verbindung mit neugebildeten Blutgefäßen stehen. Für die Entstehung und Entwicklung der RA sind insbesondere die fibroblastären Zellen der Deckzellschicht von Bedeutung, da sie für die Knorpel- und Knochendestruktion verantwortlich zu sein scheinen (28). So läßt sich in der Deckzellschicht ein gegenüber der Subintima signifikant erhöhter Spiegel an Serin-, Cystein- und Metalloproteinasen feststellen (29), die wahrscheinlich ursächlich an der Gelenkdestruktion beteiligt sind und deren Sekretion eindeutig den SFB zugeordnet werden kann (23). Die ebenfalls erhöht exprimierten pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- α (29) werden hingegen vorwiegend von (eingewanderten) Mφ produziert. Verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine [z. B. der „vascular endothelial growth factor“ (VEGF; 30) und IL-15 (31)] werden darüber hinaus von Endothelzellen sezerniert, die auf diese Weise ebenfalls zur Aufrechterhaltung und Verstärkung der entzündlichen Prozesse beitragen (32).

Somit sind bei Untersuchungen zur Pathogenese der RA alle am Aufbau der SM beteiligten Zelltypen von Interesse. Besonders wichtig sind aber die SFB, da sie eine zentrale Rolle in der Entstehung und Entwicklung der RA einnehmen.

1.3 Die Bedeutung der SFB für die Pathogenese der RA

Die SFB sind für die Pathogenese der RA von entscheidender Bedeutung, da sie durch verschiedene pro-inflammatorische und pro-destruktive Produkte an der Gelenkentzündung und -destruktion beteiligt sind. So sezernieren sie die für die Gelenkdestruktion verantwortlichen Matrixmetalloproteinase (MMPs; 2), wie z. B. MMP-1 (interstitielle Kollagenase) und MMP-3 (Stromelysin; 33). Die SFB sezernieren zwar auch Inhibitoren der MMPs (Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases, TIMPs), z. B. den mit MMP-1 und MMP-3 interagierenden TIMP-1 (34), aber trotzdem ist das normale Gleichgewicht zwischen diesen beiden Molekülgruppen in der RA gestört, so daß die TIMPs die Gelenkdestruktion durch die MMPs nicht verhindern können (23).

Ein weiteres, für die RA-Entwicklung interessantes Phänomen ist die überschießende Sekretion der Kollagene der Typen I und III durch SFB, welche zu einer Fibrosierung der Gelenke im Verlauf der fortschreitenden Gelenkdestruktion führen (35). Die SFB zeigen in der RA also mehrere, für die Pathogenese relevante Veränderungen. Neben den schon genannten Abnormitäten weisen die SFB noch weitere Besonderheiten auf:

1. Morphologische Ähnlichkeiten mit entarteten Zellen in malignen Bindegewebstumoren (36),
2. numerische und strukturelle Chromosomen-Aberrationen (37;38;39),
3. fokale Expression verschiedener Proto-Onkogene (35;40-42),
4. Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und gewebsdestruierender Enzyme (23),
5. Erosion von Knorpel und Knochen nach Transfer in die Gelenke von SCID-Mäusen (43;44),
6. *In vitro* „Anchorage-independent growth“.

Der letzte Punkt ist allerdings nicht für RA-SFB spezifisch, da auch frühe Passagen von normalen humanen SFB unter den gleichen Bedingungen (platelet-derived growth factor- (PDGF-) Zusatz im Medium) ein ähnliches Verhalten zeigen (45). Die Ursache für die „Teil-Entartung“ der SFB in einem aktivierten, aggressiv-destruktiven Phänotyp ist bislang nicht geklärt, doch sind prinzipiell zwei verschiedene Wege der Aktivierung denkbar:

1. Eine Aktivierung als Folge einer exogenen Stimulierung durch Mediatoren von Mφ, T-Zellen oder Neuronen (6).
2. Eine Aktivierung als Folge einer endogenen Stimulierung durch genetische Veränderungen, z. B. Mutationen von Schlüsselsequenzen oder die Integration von retroviralen Sequenzen (46;47).

Die möglichen Ursachen für die SFB-Aktivierung und ihre potentielle Rolle für die Pathogenese der RA sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

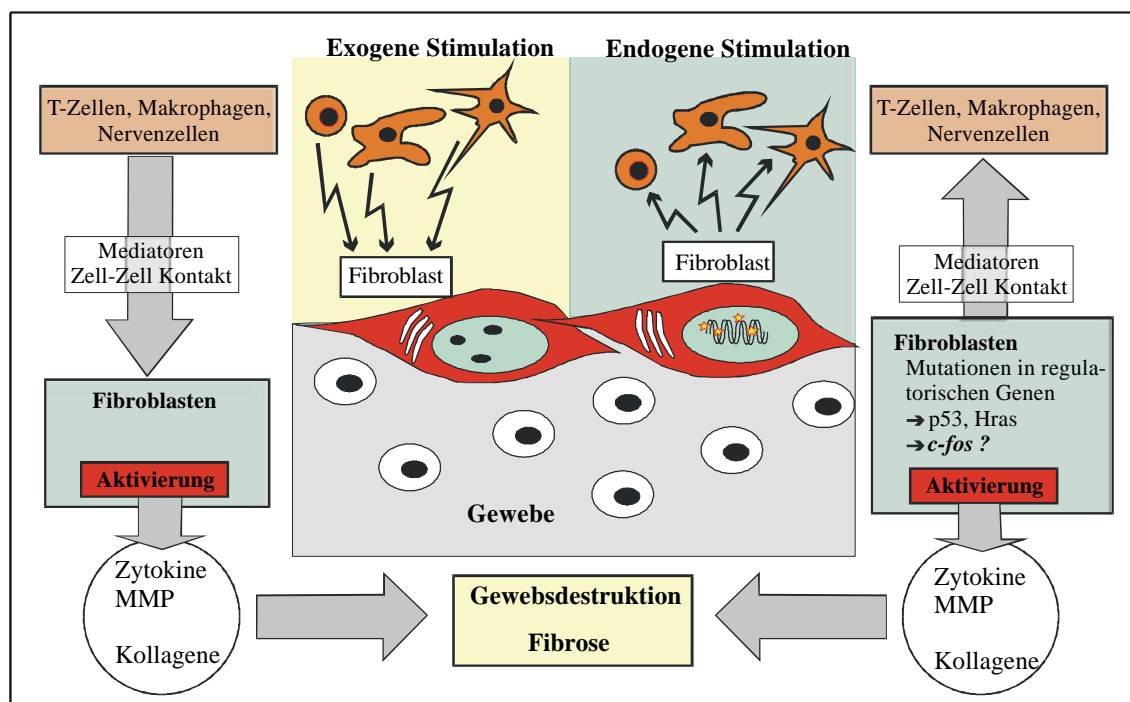


Abbildung 1: Die zentrale Rolle der SFB in der RA (nach R. W. Kinne)

Direkte Hinweise auf die Bedeutung genetischer Veränderungen bei der SFB-Aktivierung ergeben sich aus dem Nachweis von Mutationen in verschiedenen regulatorischen Genen, wie z.B. p53 oder h-ras in der entzündeten SM bzw. in SFB (48;49). Der Nachweis von p53-Mutationen dominant-negativen Charakters verdeutlicht, daß diese Mutationen auch funktionelle Auswirkungen auf die Zellen bis hin zum Funktionsverlust des betroffenen Gens/Proteins haben können (46). Weiterhin konnte in SFB eine erhöhte Expression von Proto-Onkogenen wie c-myc (50), cjun, cfos und junB gezeigt werden (35;51), wobei für die jun- und fos-Moleküle allerdings widersprüchliche Expressionsdaten vorliegen (40;50;52;53, siehe auch 1.5). Da diese Moleküle Komponenten des Transkriptionsfaktors AP-1 sind, der eine große Rolle bei proliferativen und transformierenden Prozessen spielt (54), ist die Untersuchung ihres Expressionsverhaltens in der RA besonderem Interesse. Neben einer Vielzahl von pro-inflammatorischen Molekülen werden die an der Gelenkdestruktion beteiligten MMP-1 und MMP-3 (sowie weitere MMPs) ebenfalls über AP-1 reguliert (55;56). Dies verdeutlicht zusätzlich die potentiell wichtige Rolle von AP-1 und seinen Komponenten für die Gelenkdestruktion in der RA.

1.4 Der Transkriptionsfaktor AP-1

Transkriptionsfaktoren bestehen aus einer oder mehreren assoziierenden Untereinheiten, die in der Lage sind, über DNA-bindende Proteindomänen an bestimmte DNA-Sequenzen in den Promotoren oder anderen regulatorischen Regionen ihrer Zielgene zu binden. Nach der Bindung eines Transkriptionsfaktors verstärkt (oder inhibiert) dieser die Transkription des jeweiligen Zielgens durch Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren oder eine Änderung der Tertiär- und Quartärstruktur der DNA, die die Bindung weiterer Faktoren beeinflusst (57).

Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist ein Homo- oder Heterodimer aus Proteinen der Jun-Familie, deren wichtigste Dimerisierungspartner aus der Familie der Fos-Proteine stammen. Zur Jun-Familie gehören die Proteine cJun, JunB und JunD; die Fos-Familie besteht neben cFos, dem Hauptvertreter der Familie, aus den Molekülen FosB, „Fos-related antigen“ (Fra) 1 und Fra 2. Einige Charakteristika dieser Gene können der Tabelle 1 auf der folgenden Seite entnommen werden.

Die Dimerisierung der Jun- und Fos-Proteine wird durch eine c-terminale „Leucine-Zipper“ Domäne vermittelt. Dabei werden nur Jun-Homo- oder Jun/Fos-Heterodimere gebildet, die Bildung von Fos-Homodimeren findet nicht statt. Durch die Dimerisierung wird zudem die Translokation des Transkriptionsfaktors aus dem Zytoplasma in den Kern ermöglicht (58).

Tabelle 1: Charakteristika der jun- und fos-Proto-Onkogene.

Gen	genomische Lokalisation	codierende Region (in bp)	GC-Gehalt (in %)	Introns	Protein (AS)
cjun	1p32-1p31	996	56	keine	332
junB	19p13.2	1044	61	keine	348
junD	19p13.1-19p12	1044	70	keine	1. Startcodon: 348 2. Startcodon: 340
cfos	14q24.3	1143	48	3	381

In der Nachbarschaft der „Leucine-Zipper-“ Domäne befindet sich in jedem Jun- und Fos-Molekül eine basische Region (54). Die basischen Domänen der beiden AP-1-bildenden Komponenten liegen nach der Dimerisierung in einer für die DNA-Bindung günstigen Konformation vor und sind für die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA verantwortlich (59). AP-1 assoziiert mit der DNA an verschiedenen Bindungsstellen, wie dem „TPA response element“ (TRE, Konsensussequenz: TGACTCA) oder dem „cAMP responsive element“ (CRE, Konsensussequenz: TGACGTCA) in den Promotoren seiner Zielgene (60). Das TRE wird dabei meist von „klassischen“ AP-1-Komplexen aus Jun- und Fos-Untereinheiten gebunden, während das CRE von AP-1-Komplexen bevorzugt wird, die neben einer Jun- oder Fos-Untereinheit einen weiteren Faktor enthalten, der nicht zur Jun- oder Fos-Familie gehört (z. B. Maf oder ATF, siehe 1.5.5; 61). Die als Transaktivierung bezeichnete Stimulierung der Transkription von Zielgenen erfolgt dabei einerseits durch eine Interaktion zwischen AP-1 und anderen Transkriptionsfaktoren, z. B. Proteinen der „E26 transformation specific“-Familie (Ets; 62) oder den Transkriptionsfaktor IID (TF IID; 63;64). Andererseits ist die Transaktivierung wahrscheinlich auch von einer Biegung der DNA durch AP-1 abhängig (65;66), die Interaktionen zwischen weiteren Transkriptionsfaktoren ermöglicht.

Die Transaktivierungsaktivität der Fos-Proteine wird durch zwei voneinander unabhängige, jedoch benachbarte und kooperativ agierende N-terminale Regionen vermittelt, während Jun-Proteine nur über eine dieser Regionen verfügen (59). Diese Regionen sind auch für die transformierenden Eigenschaften einiger Jun- und Fos-Proteine verantwortlich (67). In cJun/cFos-Heterodimeren wird eine Modulation der Transaktivierungsaktivität durch weitere regulatorische Regionen hervorgerufen, die zu einer Begrenzung der kooperativen Transaktivierungsaktivitäten der beiden Dimer-Untereinheiten führen (59).

Ausgehend von *in vitro* Versuchen kann dabei den regulatorischen Sequenzen der cJun-Untereinheiten ein stärkerer Einfluß auf die Stimulierung der Transkription zugerechnet werden. Die cFos-Komponente wirkt sich hingegen durch eine Inhibition der Transkription eher einschränkend auf die kooperative Transaktivierungsaktivität von cJun/cFos-Heterodimeren aus (59). In Abbildung 2 ist die Proteinstruktur der Jun- und Fos-Proteine (A) und ihre Bindung an die DNA (B) schematisch dargestellt.

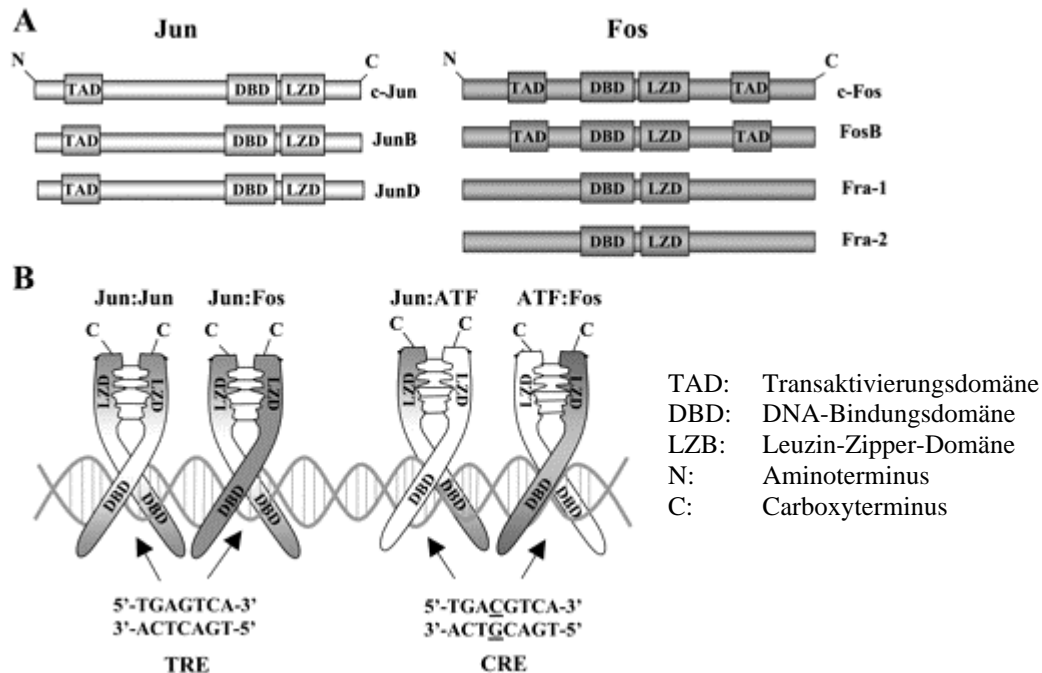


Abbildung 2: (A) Proteinstruktur der Jun- und Fos-Proto-Onkoproteine und (B) Bindung klassischer und nicht-klassischer AP-1-Komplexe an die DNA [modifiziert nach (68)].

Zu den (ca. 1000) AP-1-abhängigen Genen gehören u. a. die für die RA interessanten Proteasen MMP-1 und MMP-3 (55;56), aber auch die für den Zellzyklus wichtigen Gene wie Cyclin D, was die Bedeutung des AP-1-Komplexes für die G₀-/G₁-Transition erklärt (69). Interessanterweise konnte in der RA-SM eine erhöhte Bindungsaktivität von AP-1 an die DNA nachgewiesen werden. Diese erhöhte Bindungsaktivität ist dabei sowohl von der Expression von cjun und cfos abhängig (70), als auch von der Beteiligung weiterer, streßinduzierter Faktoren, z. B. dem Hitzeschockprotein HSP90 (71).

1.5 Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP-1

Die Expression aller Jun- und Fos-Proteine (mit Ausnahme von JunD) kann innerhalb von Minuten durch Phorbol ester, Serum, verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine ausgelöst werden, weshalb sie als „immediate-early response“ Gene bezeichnet werden (54). Zu den jun/fos-stimulierenden Wachstumsfaktoren und Zytokinen gehören u. a. das „growth hormon“ (GH; 72), der „nerve growth factor“ (NGF; 73), PDGF und der „transforming growth factor β “ (TGF- β ; 74)] bzw. IL-1, IL-17 oder TNF- α (75;76). Weitere streßinduzierende Stimuli, die zur verstärkten Expression und/oder Aktivierung dieser Proto-Onkogene führen sind γ - (77), Röntgen- (78) und UV-Strahlung (79). Hinzu kommen Hitze- oder osmotischer Schock (77;80) sowie Druck und Zug (81). Außerdem ist bekannt, daß auch einige Hormone zur Induktion von Mitgliedern der jun- und fos-Genfamilien in der Lage sind. So führt das Thyrotropin-freisetzende Hormon (thyrotropin releasing hormone, TRH), das in der RA auch an der erhöhten Freisetzung von Hormonen beteiligt ist (82), zur Induktion von cfos und junB (83). Die Struktur der jun- und fos-Promotoren und die wichtigsten der an der jun- und fos-Genexpression beteiligten Transkriptionsfaktoren können der Abbildung 3 auf der folgenden Seite entnommen werden.

Sowohl die nach der Induktion gebildete mRNA als auch die Proteine der jun- und fos-Familien weisen insgesamt relativ kurze Halbwertszeiten (HWZ) auf, wodurch die Wirkung von AP-1 auf die Expression AP-1-abhängiger Gene zeitlich begrenzt wird. Für die mRNA konnten HWZ von 10 bis 20 min nachgewiesen werden (84), für die Proteine HWZ von 10 bis 60 min (54;85), wobei die HWZ der Proteine jedoch nach starker Stimulierung (z. B. mit 20% FCS) verlängert werden kann (69). Die längste mRNA- bzw. Protein-HWZ zeigt dabei junD, da die junD-mRNA lediglich über ein einziges AU-reiches Element (ARE) verfügt, das für die mRNA-Degradation verantwortlich ist (86). Die cfos-mRNA enthält dagegen drei ARE (87) und die c-jun-mRNA drei lange ARE-Domänen (88;89, siehe auch 1.6). Außerdem wird das JunD-Protein nicht wie z. B. cJun einer Multiubiquitinylierung unterworfen, die zur Proteindegradation führt (90).

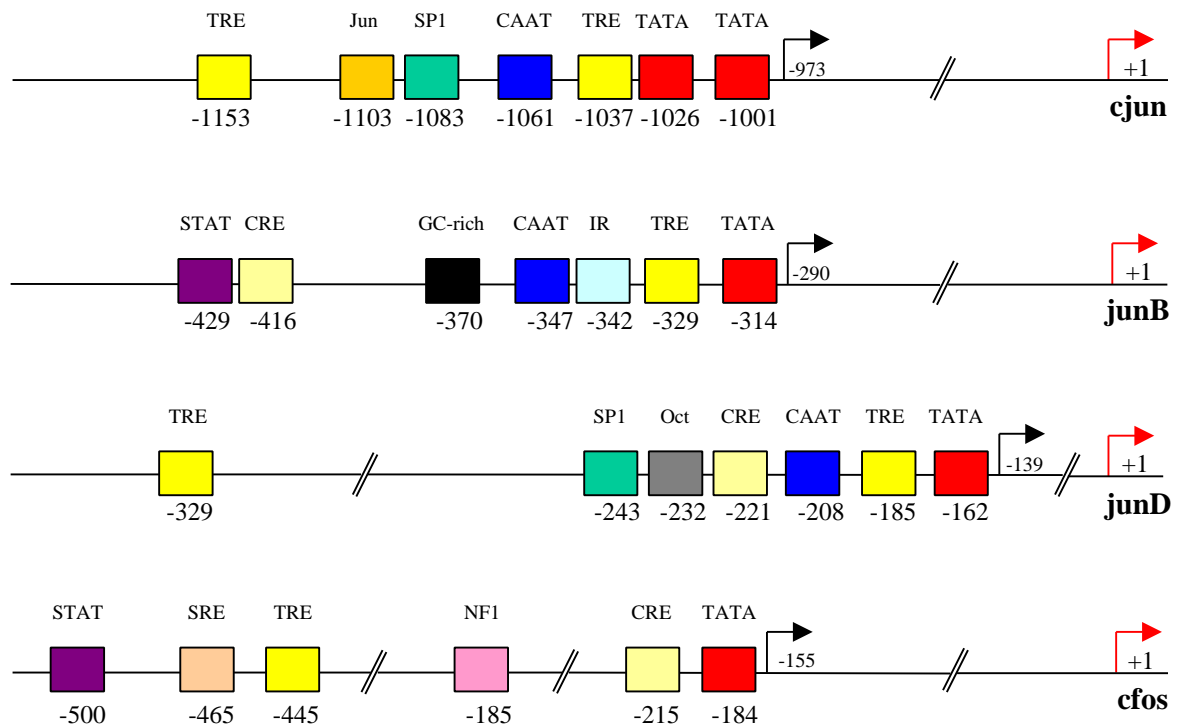


Abbildung 3: Promotorstruktur der jun- und fos-Gene [modifiziert nach (91)].

Schwarze Pfeile: Transkriptionsstartpunkte, rote Pfeile: Translationsstartpunkte; um Ungenauigkeiten in den Positionsangaben aufgrund widersprüchlicher Daten über den Transkriptionsstart zu vermeiden, wurde der Translationsstart als Position +1 definiert. TATA: TATA-Box, bindet TATA-Box-bindendes Protein (TBP); TRE: bindet AP-1; CAAT: CAAT-Box, bindet u. a. „CAAT enhancer binding protein“ (C/EBP); SP1: SP1-Box, bindet „specificity protein 1“ (SP1); NF-1: bindet „nuclear factor 1“ (NF-1); Jun: bindet Jun/NF1-Dimere; IR: „inverted repeat“, vermittelt Induktion durch Phorbol ester und Proteinkinase A; GC-rich: GC-reiche Region, bindet u. a. Egr-1 und SP1; CRE: bindet „nicht-klassische“ AP-1-Dimere; STAT: STAT-Box, bindet STATs; Oct: Octanukleotid-Sequenz, bindet u. a. „Octamer transcription factor 1“ (OTF-1); SRE: „serum response element“, bindet „serum response factor“ und „ternary complex factor“ (68;92-96).

Die Aktivierung der Jun-Proteine erfolgt vor allem durch Phosphorylierung. Die Phosphorylierung von cJun und JunD wird durch die zur Familie der „stress-“ oder „mitogen-activated protein kinases“ (SAPK/MAPK) gehörenden „Jun N-terminal kinase“ (JNK) bewirkt, die über den MAPK-Signaltransduktionsweg aktiviert wird (siehe Abbildung 4, Seite 12; 97-99). cJun verfügt über eine entsprechende Domäne für die Bindung zur JNK, die sogenannte δ -Domäne (100-102). JunB wird hingegen hauptsächlich durch Kinasen aktiviert, die zur Familie der „extracellular signal-regulated kinases“ (ERK) gehören (103). cFos wird, wie JunB, über den ERK-Signaltransduktionsweg aktiviert und von den ERK-abhängigen Serin/Threonin-Kinasen p90RSK oder Fos-Kinase phosphoryliert (siehe Abbildung 4, Seite 12; 73;104). Tatsächlich verfügen sowohl JNK als auch ERK in RA über eine pathologisch erhöhte Aktivität (105;106), wahrscheinlich in Abhängigkeit von der Induktion durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 (106), mit der Folge einer verstärkten Phosphorylierung

und Aktivierung von Jun (und Fos; 52;105). Die wichtigsten der zur Expression und Aktivierung der jun- und fos-Gene führenden Signaltransduktionswege sind in Abbildung 4 auf der folgenden Seite vereinfacht dargestellt.

Die Komposition der AP-1-Komplexe wirkt sich darüber hinaus auch auf ihre Stabilität aus, da aus Jun und Fos gebildete Heterodimere stabiler als Jun-Homodimere sind, was zu einer verlängerten Bindung von Heterodimeren an die DNA führt (60). Die konkrete Zusammensetzung der AP-1-Komplexe entscheidet auch über ihre Spezifität für verschiedene Bindungssequenzen (107). So weist von zwei AP-1-bindenden Sequenzen im MMP-1-Promotor die erste eine erhöhte Affinität für die Bindung von AP-1-Faktoren auf, die cFos und JunD enthalten. Die zweite Sequenz hingegen wird von Fra-2-enthaltenden Dimeren bevorzugt (55). So können verschiedene zelluläre Prozesse, wie z. B. Proliferation oder Differenzierung, über eine Verschiebung in der AP-1-Zusammensetzung und die sich daraus ergebende Änderung der exprimierten Zielproteine gesteuert werden (108;109). Eine Änderung im Expressionsprofil der jun- und fos-Gene, die in einer veränderten Zusammensetzung der vorherrschenden AP-1-Komplexe resultiert, könnte auf diese Weise zu einer verstärkten oder reduzierten Expression verschiedener Gene führen und zur Pathogenese von Erkrankungen wie der RA beitragen.

Für die AP-1-getriebene Expression aller AP-1-abhängigen Gene ist es deshalb von entscheidender Bedeutung, in welcher Zusammensetzung und Menge die jeweiligen AP-1-Komplexe vorliegen und über welche AP-1-bindenden Sequenzen die Promotoren der Zielgene verfügen. Dies äußert sich z. B. in der Verfügbarkeit und Stabilität des Komplexes, der Affinität des vorliegenden Komplexes für eine bestimmte Bindungsstelle und der Stabilität der Bindung des Komplexes an die DNA; (60;110). Hinzu kommt die Kooperation mit anderen Promotorelementen, die ebenfalls von TPA- oder Zytokin-induzierten Transkriptionsfaktoren gebunden werden und die zur Modulation der Stärke der AP-1-abhängigen Expression beitragen (111, siehe auch 1.5.4).

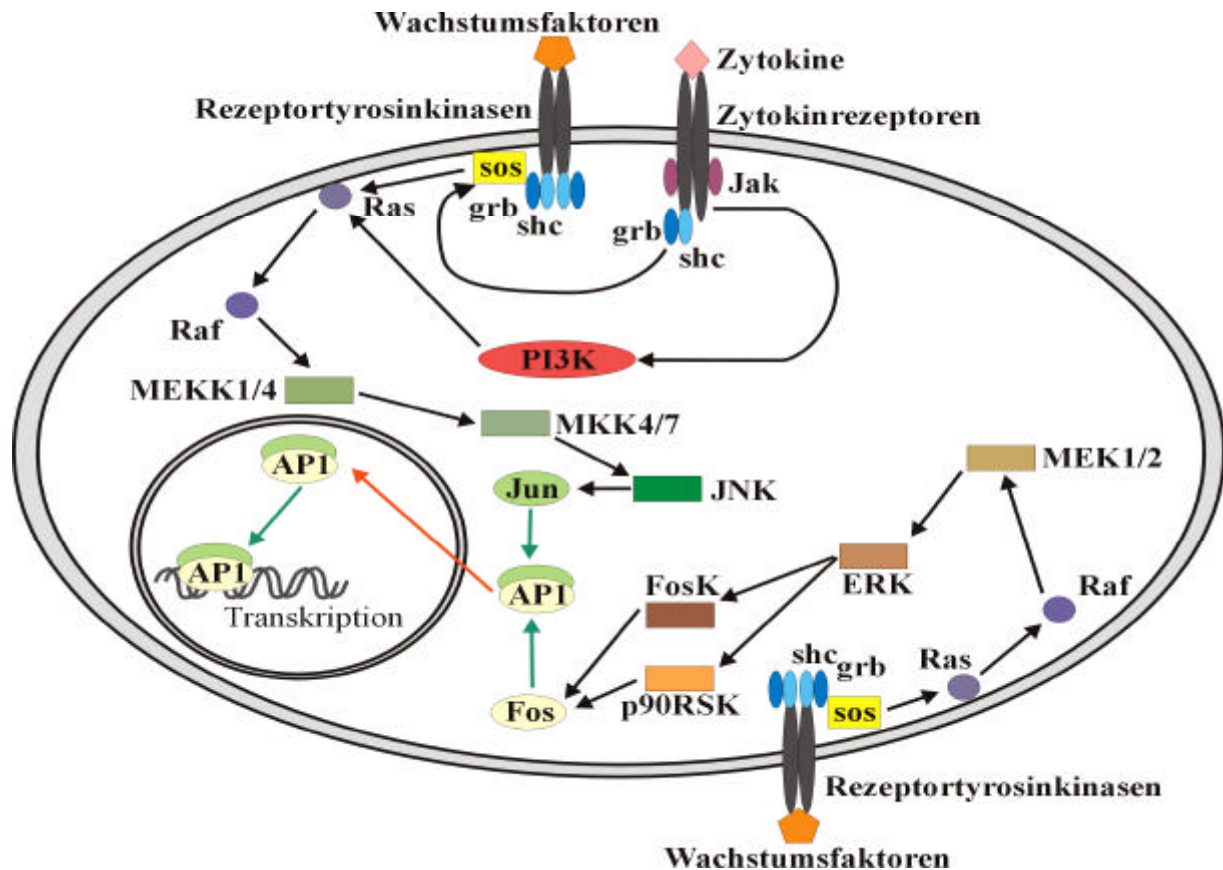


Abbildung 4: Wichtige Signaltransduktionswege zur Aktivierung von Jun und Fos.

Schwarze Pfeile: Aktivierung, grüne Pfeile: Assoziation, rote Pfeile: Translokation; grb: growth factor receptor-binding protein (Grb-2), shc: src-homology-2 (SH-2) domain-containing protein, sos: Guaninnukleotid-Austauschfaktor für Ras („son-of-sevenless“), Ras: kleines GTP-bindendes Protein Ras („rat sarcoma“), Raf: MEKK-/MEK-aktivierende Protein-Kinase Raf, MEKK: MEK-Kinase, MKK: MAPK-Kinase, JNK: Jun N-terminale Kinase, PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, MEK: MAPK- oder ERK-Kinase, ERK: extracellular-regulated kinase, FosK: Fos-Kinase, p90RSK: Serin/Threonin-Kinase p90RSK.

Zum Expressionsprofil der jun/fos-Gene in der RA existieren widersprüchliche Daten. In einer Reihe von Studien konnte ein erhöhtes Expressionsniveau von jun-/fos-mRNA in der RA-SM (52) und SFB (50) nachgewiesen werden. In anderen Studien konnten diese Ergebnisse hingegen nicht bestätigt werden (40;53). Allerdings stützt die begrenzte Lokalisation von cfos mRNA in der SM-Deckzellschicht (53) und an der Knorpel-Pannus-Grenze (29) eher die Vermutung einer eingeschränkten Expression von jun- und fos-Proto-Onkogen-mRNA in der RA-SM. Da bisher also noch unklar ist, wie stark die einzelnen jun- und fos-Moleküle in der RA exprimiert werden, bedarf diese Frage der weiteren Klärung. Dies ist vor allem deshalb von Bedeutung, weil sich die verschiedenen Jun- und Fos-Proteine unterschiedlich auf die Expression ihrer Zielgene auswirken und damit auf verschiedenen Wegen die RA-Entwicklung beeinflussen können.

1.5.1 Biologische Eigenschaften von cJun und cFos

cJun und cFos (Strukturen siehe Abbildung 2A auf Seite 8), sein wichtigster Dimerisierungspartner aus der fos-Genfamilie, besitzen als Transkriptionsfaktor-Proteine einen eindeutig aktivierenden Charakter. So führt die Transfektion von Zellen mit cjun, wie auch die Co-Transfektion von c-jun und c-fos, zu einer verstärkten Aktivierung AP-1-abhängiger Gene sowie einem onkogen transformierten Phänotyp der Zellen (94;112) und stellt darüber hinaus eine notwendige Voraussetzung zur Immortalisierung der Zellen dar (113). Mit cjun-transfizierte Fibroblasten sind außerdem in der Lage, in Medium mit geringem Serumanteil zu wachsen und auf Agarflächen Kolonien zu bilden („anchorage-independent growth“) und zeigen ein erhöhtes Maß an Motilität und Invasivität (114;115), was ebenfalls für transformierte Zellen charakteristisch ist (67). Bei cfos-transfizierten Chondrozyten konnte eine deutliche Erhöhung der für die RA-Progression wichtigen MMP-Produktion bei gleichzeitiger Reduktion der TIMP-Synthese nachgewiesen werden (116), was den Einfluß von cFos auf den Gewebe-Umbau zeigt. Der positive Effekt auf proliferative Prozesse konnte für cfos u. a. durch den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden (117;118) und für cjun durch knock-out-Experimente in Mausfibroblasten gezeigt werden (119). Beide Ansätze führen zur Inhibition der Fibroblasten-Proliferation

Die große Bedeutung von cfos und cjun für alle proliferativen Prozesse lässt sich auch in Tiermodellen bestätigen. Diese vermitteln zwar nur ein artifizielles Bild von der Rolle der Jun- und Fos-Proteine in humanen Zellen/Geweben, ermöglichen aber doch wichtige Rückschlüsse auf ihre allgemeinen Funktionen. So sind cfos-knock-out-Mäuse zwar lebensfähig, zeigen aber schwere Wachstums- und Entwicklungsstörungen sowie Störungen im Gewebeumbau und bei der Gewebedifferenzierung, vor allem in der Knochenentwicklung und der Blutbildung (120). Allerdings zeigen solche Mäuse auch eine geringere Neigung zur Bildung von malignen Tumoren (121). Mäuse die einen cfos-knock-out auf nur einem Allel aufweisen entwickeln sich hingegen normal (120). Ein Knock-out des Gens cjun stört die embryonale Entwicklung der Maus so nachhaltig, daß derartige Mäuse ihre Entwicklung nicht vollenden und während der Embryonalentwicklung zwischen dem 12. und 13. Tag sterben (122).

1.5.2 Biologische Eigenschaften von JunB

Das Proto-Onkoprotein JunB (Struktur siehe Abbildung 2A auf Seite 8) zeigt in seinen biologischen Eigenschaften ein weniger eindeutiges Bild, da es gleichermaßen über aktivierende und deaktivierende Eigenschaften verfügt. So zeigen junB-transfizierte Zellen zwar auch einige Merkmale transformierter Zellen, da sie ebenfalls auf Agarflächen Kolonien bilden, jedoch in geringerem Maße als cjun-transfizierte Zellen (67;119). Im Gegensatz zur Transfektion mit cjun befähigt eine Transfektion von Fibroblasten mit junB die Zellen nicht

zu Wachstum in Medium mit geringer Serumkonzentration (67) bzw. bewirkt keine Immortalisierung (113). Wird junB mit cjun und c-H-ras co-transfiziert, ist der transformierte Phänotyp der betroffenen Zellen deutlich schwächer ausgeprägt, als bei einer Transfektion ohne Beteiligung von junB (94). In diesem Fall hemmt JunB also die Transformation durch cJun und c-H-Ras. Die Transaktivierungsaktivität von cjun- und cfos-enthaltenden AP-1-Komplexen wird durch junB ebenfalls reduziert (94), jedoch nicht völlig neutralisiert (123).

Für den Einfluß von JunB auf Proliferation und Differenzierung gibt es in der Literatur widersprüchliche Daten. So scheint JunB in der Lage zu sein, die aktivierenden Eigenschaften von cJun in der Entwicklung der Maus und der Proliferation muriner Zellen in cjun-knock-out-Modellen zu substituieren (124). Außerdem zeigen Versuche mit junB-knock-out-Mäusen, daß JunB für die allgemeine Entwicklung unverzichtbar ist, da diese Mäuse nicht entwicklungsfähig sind und zwischen dem 8. und 10. Tag der Embryonalentwicklung sterben (125). Mäuse mit einer induzierbaren Hemmung der junB-Expression sind zwar lebensfähig, weisen aber deutliche Defekte in der Entwicklung und Proliferation von Osteoblasten und Osteoklasten auf (126), was die zentrale Bedeutung von junB für eine normale Entwicklung vieler Zelltypen zeigt. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, daß JunB durch die Induktion des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p16^{INK4a} die Proliferation primärer muriner Zellen hemmt (127). JunB ist also in der Lage, in Abhängigkeit von seinen Bindungspartnern und dem jeweiligen Zellzustand sowohl aktivierende als auch deaktivierende Aufgaben zu übernehmen.

1.5.3 Biologische Eigenschaften von JunD

Während die Expression der anderen Jun- und Fos-Proteine durch verschiedene Stimuli (wie Phorbol ester und Zytokine) induzierbar ist, ist junD (Struktur siehe Abbildung 2A auf Seite 8) einer Stimulierung gegenüber nahezu unempfindlich (54) und wird in den meisten Zellen konstitutiv exprimiert (86;128), wahrscheinlich auf der Basis positiver und selektiver Autoregulation durch JunD-Homodimere (93). Interessanterweise wurde unter Einfluß von TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Azetat) sogar eine Expressionsreduktion eines Reporterkonstruktes mit einem humanen junD-Promotor beobachtet (92), die bei den anderen jun- und fos-Genen zu einer Stimulierung der Genexpression führt.

JunD weist im Gegensatz zu cFos und cJun bei der Transfektion von Fibroblasten keinerlei transformierende Eigenschaften auf (67;129;130). Bei einer Überexpression von murinem JunD in NIH-3T3-Zellen wurden sogar eine Suppression der Proliferation und eine deutliche Verminderung eines durch k-ras-Transfektion herbeigeführten transformierten Phänotyps beobachtet. Außerdem sind erhöhte JunD-Protein-Spiegel in Maus-Fibroblasten während der Zellzyklus-Ruhephasen (G₀ und G₁) zu beobachten (131), was möglicherweise für eine Hemmung der Zell-Proliferation durch JunD spricht.

JunD-Proteine konnte in bisherigen Untersuchungen nicht oder nur in sehr geringen Mengen in histologischen Schnitten von RA-Patienten nachgewiesen werden (35). In RA-SFB konnte bei einer Überexpression von JunD sogar eine Suppression der Proliferation sowie eine Inhibierung der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-6) und Proteasen (MMP-1) gezeigt werden (132). Dieser eher deaktivierende Charakter von JunD konnte auch im Mausmodell durch knock-out-Experimente gezeigt werden, da junD-negative Mäuse keine Proliferationsdefizite zeigen, dafür aber über abnorme TNF- α -Spiegel und eine verminderte Proliferationskontrolle verfügen (133). JunD weist also eindeutig deaktivierende Eigenschaften auf, während die anderen Mitglieder der Jun-/Fos-Familien hauptsächlich über aktivierende Eigenschaften verfügen.

1.5.4 Weitere strukturverwandte Dimerisierungspartner und Kooperation mit weiteren Transkriptionsfaktoren

Die Jun- und Fos-Proto-Onkogene können auch mit vielen anderen Transkriptionsfaktoren dimerisieren, sofern diese ebenfalls zur Gruppe der basischen „leucin-zipper-“ Proteine gehören. Dazu zählen u. a. die „Jun dimerization partners“ (JDP1 und JDP2), die „activating transcription factors“ (ATF2, ATF3, B-ATF), und die Proteine der „musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene“ (Maf-) Familie, die entweder mit cJun- und cFos (c-Maf, Nrl) oder nur mit cFos dimerisieren können (MafB, MafF, MafG, MafK; 61;110). Je nach Zusammensetzung weisen diese „nicht-klassischen“ AP-1-Komplexe verschiedene Stabilitäten auf und bevorzugen bestimmte DNA-Bindungssequenzen, die sich z. T. deutlich von den jeweiligen Konsensus-Sequenzen der TRE und CRE unterscheiden können (107;134;135). Da im Rahmen dieser Arbeit aber die Analyse der „klassischen“ AP-1-Komplexe im Vordergrund stehen sollte, wurden die „nicht-klassischen“ Komplexe nicht untersucht.

Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist jedoch nicht allein für die Expression eines bestimmten Zielgens verantwortlich, sondern kooperiert mit einer Reihe von weiteren Faktoren. Zu den im Rahmen der RA-Pathogenese wichtigsten Faktoren gehören dabei der „nuclear factor κ B“ (NF κ B; 51;136;137), der „signal transducer and activator of transcription“ (STAT; 77) und der „early growth response factor 1“ (Egr-1; 41;138).

Diese Transkriptionsfaktoren wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, da sie für die Funktion der SFBs von geringerer Bedeutung zu sein scheinen. So wird NF κ B in M ϕ , nicht jedoch SFB verstärkt exprimiert (136). Die STATs sind an der Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten und T-Helferzellen beteiligt (139;140), für die Entwicklung von SFB spielen sie aber eine untergeordnete Rolle. Und Egr-1 ist zwar in der RA-SM und in RA-SFB überexprimiert (41;138;141) und an der Expression pro-inflammatorischer Moleküle

wie TNF- α beteiligt (142), zeigt jedoch auch deutliche deaktivierende Eigenschaften, wie eine Erhöhung der Expression der MMP-inhibierenden TIMPs (143). Da das physiologische Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs angesichts der (AP-1-abhängigen) Überexpression von MMPs trotzdem gestört ist (23;29), scheint auch der Einfluß von Egr-1 begrenzt zu sein.

1.6 Post-transkriptionale Regulation in Abhängigkeit von verschiedenen mRNA-stabilitätsmodifizierenden Proteinen

Die grundlegende mRNA-Stabilität der jun- und fos-Proto-Onkogene wird über den Poly-A-Schwanz der mRNA reguliert. Im Zellkern wird der mRNA-Strang durch die Poly-A-Polymerase polyadenyliert; an diesen Poly-A-Schwanz binden jeweils mehrere Moleküle des humanen Poly-A-bindenden Proteins (hPABP), wodurch die mRNA stabilisiert und die Initiation der Translation ermöglicht wird (144). Die funktionell aktive mRNA wird dann an Ribosomen/Polysomen gebunden und translatiert, bis der Abbau der mRNA erfolgt (145). Dieser Abbau beginnt in der Regel mit der Abspaltung des Poly-A-Schwanzes durch eine poly(A)-spezifische Endonuklease; an diesen schließt sich eine schnelle Abspaltung von RNA-Abschnitten vom 5'-Ende her durch Endo-Ribonukleasen an. Der Abbau dieser abgetrennten Abschnitte erfolgt dann durch Exo-Ribonukleasen in 3'-5'-Richtung (146;147).

Zusätzliche Sequenzen, die zur Stabilisierung oder Destabilisierung kurzlebiger mRNA-Spezies beitragen können (88;148;149), sind Adenosin- (A) und Uridin- (U) reiche Elemente (ARE; 86;88;150). Diese sind in der 3'-nichttranslatierten Region der mRNA verschiedener Zytokine, Wachstumsfaktoren und Proto-Onkogene enthalten (z.B. jun- und fos-Gene; 88) und können in drei Klassen eingeteilt werden. Klasse I ARE bestehen aus 1 bis 3 AUUUA-Pentameren (z. B. in cfos), Klasse II ARE enthalten mindestens zwei überlappende Nonamere mit der Sequenz UUAUUU(U/A)(U/A)U (z. B. in TNF- α). Klasse III ARE weisen keine definierbare Sequenz auf, sondern zeichnen sich durch lange, U-reiche Abschnitte aus (z. B. in cjun; 88). Die im Zytoplasma erfolgende Bindung ARE-bindender (151), mRNA-**destabilisierender** Proteine wie des „AU-rich element binding factors 1“ (AUF-1; 152) oder des Proteins Tristetraprolin (TTP; 153) beschleunigen die Deadenylierung des Poly-A-Schwanzes der mRNA bzw. den darauf folgenden RNA-Abbau (154). Die mRNA-**stabilisierenden** Proteine, wie das „human antigen R“ (HuR; 155), erhöhen hingegen die mRNA-Halbwertszeit durch die Stabilisierung von mRNA-Intermediaten nach Abspaltung des Poly-A-Schwanzes (156;157).

Das mRNA-stabilisierende HuR, in der Literatur z. T. auch als HuA bekannt (158), ist ein 34 kDa großes (159), ubiquitär exprimiertes Mitglied der hochkonservierten, ansonsten nur in Neuronen exprimierten Familie der „embryonic lethal abnormal vision“- (ELAV-) Proteine

(HuC, HuD und Hel-N; 155). Diese Proteinfamilie ist durch zwei N-terminale und ein C-terminales RNA-Erkennungsmotiv („RNA recognition motifs“, RRM) charakterisiert, die die Bindung an ARE in der die RNA vermitteln (160). HuR ist durch die Stimulierung mit Serum induzierbar (161) und inhibiert nachweislich den ARE-vermittelten Abbau der cfos-mRNA (155). Dies trifft – wenn auch in geringerem Maße – auch auf die cjun-mRNA (162), sowie weitere, kurzlebige mRNA-Spezies zu (z. B. TNF- α oder c-myc; 158;163).

Das mRNA-destabilisierende Protein AUF-1 ist auch als „heterogeneous nuclear ribonucleic particle D“ (hnRNP D) bekannt (164) und liegt in vier Isoformen vor (45, 42, 40 und 37 kDa; 165), deren aktivste Form p37^{AUF} ist (166). Da eine Überexpression von AUF-1 im Mausmodell zu einer onkogenen Transformation der Zellen führt (167), scheint es ein wichtiger Regulator des Abbaus verschiedener in die Proliferationskontrolle eingebundener Proteine zu sein.

Das ebenfalls mRNA-destabilisierend wirkende TTP, das die alternativen Bezeichnungen „nuclear protein 475“ (Nup475), „TPA-induced sequence 11“ (TIS11) und „G0/G1 switch regulator gene 24“ (G0S24) trägt (168;169), ist ein durch verschiedene Stimuli (wie z. B. Serum, IL-4 und TGF- β) induzierbares, über Stunden stabiles Protein (170-172). Es wird dabei in drei Isoformen exprimiert (43 kDa, ca. 47 kDa und 48 kDa; 173). Es gehört (neben ZFP36L1 und ZFP36L2) zu einer kleinen Familie von Zinkfingerproteinen mit einem ungewöhnlichen Tandem-Zinkfinger-Motiv, das auf der Bindung von Zn²⁺ durch jeweils drei Cysteine und ein Histidin beruht (CCCH-Motiv; 174). Anders als AUF-1 zeigt es eine mit HuR überlappende Bindungsspezifität für bestimmte Regionen auf der mRNA (158). TTP wurde bereits als Arthritis-Suppressorgen beschrieben, da der Mangel an TTP in TTP-defizienten Mäusen zur Ausprägung eines arthritischen Phänotyps führt (175;176). Da andererseits in RA-SM eine erhöhte Menge an TTP nachgewiesen wurde (177), ergeben die Literaturdaten auch in diesem Fall ein uneinheitliches Bild. Eine endgültige Klärung des Einflusses dieser mRNA-stabilitätsmodifizierenden Proteine auf die Regulation der jun- und fos-mRNA in der RA steht also noch aus.

1.7 Der Einfluß von Mutationen und Polymorphismen in relevanten Genen auf die Pathogenese der RA

Für viele pathogenetisch relevante Gene konnte gezeigt werden, daß die Entwicklung der Krankheit nicht durch ihre „normale“ Proteinvariante, die sogenannte Wildtyp-Form (wt), sondern durch eine Variante mit abweichender Nukleotidsequenz hervorgerufen bzw. gefördert wird. Dies trifft in der Regel aber nur dann zu, wenn die abweichende Nukleotidsequenz auch in einer funktionell relevanten Änderung der Aminosäuresequenz resultiert. Diese veränderten Nukleotidsequenzen können entweder Mutationen sein, die in weniger als 1% der Bevölkerung auftreten, oder Polymorphismen („single nucleotide

polymorphisms“, SNPs), die in einer höheren Frequenz (>1%) vorliegen. Solche zur Ausbildung von Krankheiten führenden Mutationen oder SNPs können vererbt sein - wie im Falle des Sichelzell-Hämoglobins bei der Sichelzellanämie (178) -, oder erst im Laufe des Lebens durch eine somatische Mutation erlangt werden. Letzteres gilt z. B. für Mutationen im Gen *btk* für die B-Zell-Tyrosinkinase bei der Agammaglobulinämie (179), für einige Veränderungen des Cl⁻-Ionenkanals „cystic fibrosis transmembrane conductance regulators“ (CFTR) bei der cystischen Fibrose (180) und für den Tumorsuppressor p53 bei verschiedenen Krebserkrankungen (181;182). Bei Mutationen, die zu einer Dysfunktion von p53 führen, sind vor allem solche Regionen betroffen, die für die Interaktion mit anderen Proteinen oder die DNA-Bindungsaktivität von p53 verantwortlich sind. Diese Regionen vermitteln physiologischerweise die tumorsuppressive Wirkung von p53 mittels Zellzyklus-Arrest oder Apoptose-Induktion (182).

Bei Genanalysen in der RA-SFB konnten ebenfalls verschiedene mutierte Varianten des Gens p53 nachgewiesen werden (46;48;183). Darunter fand sich auch eine bei verschiedenen Krebserkrankungen häufig identifizierte Mutation (GGC → GAC), die zum Austausch der Aminosäure Glycin zu Aspartat an der Position 245 führt (G245D). Da diese funktionelle Mutation in Krebszelllinien eine erhöhte Proliferation und „anchorage-independent growth“ induziert (184), ist sie möglicherweise auch bei den betroffenen RA-Patienten an der Induktion einer abnormalen SFB-Proliferation beteiligt (183). Andere in der RA beschriebene Mutationen (AAC → AGC und CGA → TGA) ziehen den Austausch von Asparagin zu Serin (N239S) oder die Umwandlung des Codons für Arginin in ein Stop-Codon nach sich (R213*). Diese beiden als dominant-negativ charakterisierten p53-Mutanten unterdrücken dabei die natürliche Funktion von wt-p53 und behindern so seine Funktion als Tumorsuppressor (46), was zur erhöhten Proliferation und dem „semi-transformierten“ Phänotyp der RA-SFB beitragen könnte.

Auch von den Jun- und Fos-Proto-Onkoproteinen sind mutierte Formen bekannt, die z. T. veränderte Protein-Funktionen aufweisen. Mutationen im Gen *cjun*, die in AS-Austauschen an den Phosphorylierungsstellen resultieren (z. B. Ser63Ala und Ser73Ala), führen in Folge der inhibierten Phosphorylierung von cJun zum Verlust seiner Transaktivierungsaktivität (185). Andere Mutationen, die die saure Aktivierungsdomäne des Gens *cfos* betreffen (Arg125Lys), zeigen in Reporter-gen-Assays eine erhöhte Transaktivierung von RA-relevanten Genen (wie MMP-1) in RA-SFB (z. B. 186). Bisher wurden allerdings nur wenige Mutationen in den *jun*- und *fos*-Genen beschrieben.

Mutationen/SNPs sind also immer dann von besonderer Bedeutung, wenn sie in der codierenden Region lokalisiert sind und zu einem Aminosäureaustausch führen, der wiederum eine Änderung der Verhaltensweise des Proteins nach sich zieht. Allerdings können auch Mutationen/SNPs im Promotorbereich eines Gens krankheitsrelevante Auswirkungen auf die Expression dieses Gens haben. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen innerhalb des Promotors von einem Basenaustausch betroffen sind. So führt ein A → G Austausch an der Position -239 des Melanocortin-3-Promotors zur Eliminierung einer Bindungsstelle für GATA-4 (187). Ein SNP in Form einer Insertion von Guanin an der Position -1607 im MMP-1-Promotor führt hingegen zur Bildung einer neuen Ets-Bindungsstelle mit erhöhter Ets-Bindungsaffinität und zu einer deutlichen Erhöhung der MMP-1-Expression in Fibroblasten (188). Mutationen/SNP in anderen Promotoren (z. B. dem TNF- α -Promotor oder dem „complement component 5 receptor 1“-Promotor) betreffen hingegen keine funktionellen Regionen, rufen also auch keine Änderungen im Expressionsverhalten des betroffenen Gens hervor (189;190). Dennoch können auch solche Mutationen/SNPs eine gewisse Bedeutung für Erkrankungen wie der RA erlangen, wenn ihr Auftreten statistisch signifikant mit dem Auftreten der Erkrankung assoziiert ist. Dies ist z. B. bei der Assoziation des (funktionell nicht relevanten) TNF- α -Promotor-Polymorphismus an der Position -238 (A → G) mit dem Auftreten von RA der Fall (189). Die mechanistische Grundlage dieser Assoziation ist bisher allerdings unklar.

1.8 Assoziation von Mutationen/SNP mit Erkrankungen

Die Suche nach Assoziationen von Mutationen/SNPs mit der Suszeptibilität einzelner Individuen für das Auftreten bestimmter Krankheiten (oder anderer, phänotypischer Merkmale) ist unter mehreren Gesichtspunkten von Bedeutung. Zunächst einmal ist ein SNP (oder eine Mutation), der mit dem Auftreten einer Krankheit assoziiert ist, besonders dann von Interesse, wenn er zu einer funktionellen Änderung eines für die Pathogenese der Krankheit wichtigen Parameters führt. Ein solcher SNP kann nach seiner Identifizierung mithilfe funktioneller Analysen überprüft werden und evtl. mögliche Behandlungswege aufzeigen (191). Dies kann z. B. eine veränderte Proteinfunktion infolge eines Basenaustausches oder die verstärkte bzw. verminderte Expression eines wichtigen Gens durch eine Veränderung im Promotor sein (siehe 1.7). Eine andere Möglichkeit ist ein gekoppeltes Auftreten eines funktionell nicht aktiven SNPs mit einem funktionell relevanten, aber bisher unbekannten Parameter. Obwohl der identifizierte SNP selbst keine Auswirkung auf Entstehung und Verlauf der Krankheit hat, kann er als Krankheitsmarker dienen, da er mit diesem vererbt wird („linkage“; 192).

In den letzten Jahren wurde viele Assoziationsstudien für bestimmte Erkrankungen und andere phänotypische Merkmale durchgeführt, im Jahre 2002 allein 2922 Studien (191). Obwohl in einigen Studien nachgewiesen wurde, daß sich die Verteilung von SNPs zwischen verschiedenen Gruppen deutlich unterscheiden können - wie z. B. bei der Verteilung von 5 SNPs im IL-10-Promotor in einem niederländischen (321 Individuen) bzw. in einem brasilianischen Kollektiv (293 Individuen; 193) - sind zumindest für bestimmte Subpopulationen aussagekräftige Assoziationsstudien verfügbar.

Neben Studien zu anderen Krankheiten, z. B. zur Assoziation von funktionell relevanten SNPs im CFTR-Gen mit leichten bzw. schweren Formen von Cystischer Fibrose (194) oder von SNPs im IL-10-Promotor mit einer erhöhten Suszeptibilität für den systemischen Lupus erythematosus (195), gibt es auch eine wachsende Anzahl von Studien zur Assoziation verschiedener genetischer Marker mit der RA. Klassische Assoziationen genetischer Variablen mit der RA sind z. B. der Allel-Subtyp HLA-DRB1*0401 des MHC-II-Komplexes (2), ein SNP in der 3'-nicht-translatierten Region (3'-UTR) von IL-6 (196) und des Fc γ Rezeptor-Typs IIIA (197; siehe auch 1.1). Verschiedene neuere Studien haben allerdings auch die Assoziation bestimmter SNPs mit dem Auftreten von RA trotz deren funktioneller Relevanz ausgeschlossen. Dies gilt z. B. für einen der verschiedenen SNPs in der codierenden Region des TNF-Rezeptors II (TNFR II; 198) und einen SNP im Gen für das „Follistatin-related protein“ (199). Insgesamt lässt sich aber eine ausreichend große Zahl an Assoziationen identifizieren, die als genetische Marker dienen könnten.

So zeigte sich eine Assoziation zwischen dem Auftreten von RA und einem SNP in der Bindungsstelle des „runt-related transcription factors 1“ (RUNX1) im Gen SLC22A4 („solute carrier family 22, member 4“), einem Transportprotein für kationische organische Moleküle (200). Das Auftreten eines funktionell relevanten SNPs in der NF κ B-Bindungsstelle im Promotor des Gens „Fc-receptor like family, member 3“ (FCRL3), dessen Funktion trotz seiner Homologien zum Fc γ -Rezeptor noch nicht bekannt ist, ist ebenfalls mit einer erhöhten Suszeptibilität für RA assoziiert (201). Eine weitere Assoziation mit RA wurde über eine funktionelle Variante des PADI4-Gens („peptidylarginine deiminase, citrullinating enzyme“) berichtet, die an der Citrullinierung verschiedener Peptide in der RA-SM beteiligt sein könnte (202). Allerdings konnte diese Assoziation bisher nicht in anderen (Familien-) Studien bestätigt werden (203).

Einige der interessantesten Assoziationen betreffen die Gene für TNF α und die TNF-Rezeptoren, da TNF α als pro-inflammatorisches Zytokin einen bedeutenden Einfluß auf die RA-Pathogenese hat (12;29). Insbesondere der TNF α -Promotor ist von einigen SNPs betroffen, die zu einer erhöhten Suszeptibilität für RA zu führen scheinen. Die trifft vor allem auf den SNP an Position -238 zu (189), aber auch auf die oft mit diesem SNP kombinierten SNPs an den Positionen -308 und -376 (20). Bei den TNF-Rezeptoren ist einer der SNPs in

der codierenden Region des TNFR II (Exon 6, Position 196) mit dem Auftreten der RA assoziiert, während ein SNP in der codierenden Region des TNFR I (Exon 1, Position 36) eher einen protektiven Einfluß zu besitzen scheint (204;205).

So können durch Assoziationsstudien identifizierte Mutationen/SNPs für viele Krankheiten als genetische Marker dienen, die evtl. die Entwicklung von diagnostischen/differential-diagnostischen oder therapeutischen Werkzeugen ermöglichen (191).

1.9 Rolle der Chip-basierten Mutationsanalysen für Assoziationsstudien zur Identifikation genetischer Marker

Neben den DNA-Microarrays, die der Analyse der mRNA-Expression einer stetig wachsenden Zahl von Genen dienen (z. B. 206), werden zunehmend auch Arrays konzipiert und eingesetzt, die die Analyse einer großen Anzahl von DNA-Proben im Hinblick auf das Auftreten von Mutationen/SNPs zum Ziel haben.

Mit solchen DNA-Microarrays wurden z. B. DNA-Veränderungen in Neuroblastom-Zellen (207) oder mit Hypercholesterolemie assoziierte Mutationen in humanen Proben (208) identifiziert, Genotypisierungen des *Mycobacterium tuberculosis* durchgeführt (209) oder allgemeine genetische Veränderungen untersucht, wie z. B. die genomische Akkumulation von Genkopien (210).

Ein besonders flexibles und gut an verschiedene Fragestellungen anzupassendes DNA-Microarray-System ist das in dieser Arbeit eingesetzte ArrayTube-System der Firma Clontech aus Jena. Dieses System kann individuell auf interessante Mutationen und SNPs zugeschnitten werden („Custom-Chip“). Es basiert auf der Immobilisierung von kurzen DNA-Sonden, die innerhalb ihrer Sequenz die zu untersuchenden Mutationen/SNPs enthalten, während andere DNA-Sonden zu Vergleichszwecken die wt-Sequenzen aufweisen. Durch die bevorzugte Bindung einer auf den Chip gegebenen DNA-Probe an eine der Sonden kann unterschieden werden, ob die entsprechende Probe die wt- oder die mutierte Variante des untersuchten DNA-Abschnittes enthält (siehe 2.13). Dieses System wurde schon erfolgreich eingesetzt, um Chlamydien (211) und verschiedene *Kitsatospora*-Spezies (212) detektieren und identifizieren zu können sowie um Antibiotika-Resistenzen in gram-negative Bakterien zu testen (213).

Dieses erfolgreiche Custom-Chip-System sollte als Basis für die Entwicklung eines DNA-Microarrays dienen und zur Detektion einer großen Zahl von bereits bekannten bzw. neu identifizierten Mutationen/SNPs in der codierenden Region und den Promotoren der *jun*- und *fos*-Gene dienen. Damit sollte die potentielle Assoziation dieser Mutationen/SNPs mit der Suszeptibilität für die RA überprüft werden. Der Einsatz des optimierten und validierten

DNA-Chips sollte die Untersuchung einer großen Probenanzahl von RA- und OA-Proben, sowie Proben von normalen Spendern ermöglichen. Die Entwicklung dieses Microarrays wurde im Rahmen des Jenaer Centrums für Bioinformatik durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert.

Neben der wissenschaftlichen Nutzung (z. B. im Rahmen größerer Assoziationsstudien) besteht nach einem erfolgreichen Einsatz des Systems die Möglichkeit, die gewonnenen Daten zu nutzen, um ein diagnostisches Werkzeug zur Vorhersage des individuellen Krankheitsrisikos einzelner Patienten zu entwickeln (z. B. über die Schwere des Krankheitsverlaufes, sofern dieser mit einzelnen Mutationen/SNPs assoziiert ist). Dies könnte eine kommerzielle Nutzung späterer Chipgenerationen nicht nur im wissenschaftlichen, sondern auch im medizinischen Sektor ermöglichen.

1.10 Ziele der Arbeit

Angesichts der wichtigen Rolle des Transkriptionsfaktors AP-1 für die Pathogenese der RA und die widersprüchlichen Literaturdaten zur Expression der Jun- und Fos-Untereinheiten sollte in dieser Arbeit die mRNA- und die Proteinexpression der jun- und fos-Gene analysiert werden. Außerdem sollte die mRNA- und die Proteinexpression der mRNA-stabilitätsmodifizierenden Proteine, die an der Regulation der HWZ der jun- und fos-mRNA beteiligt sind, untersucht werden. Dadurch sollte die Frage beantwortet werden, ob in der RA ein verändertes Expressionsprofil von jun und fos auf der mRNA- oder der Proteinebene nachgewiesen werden kann, das sich auf eine differentielle und für die RA spezifische Regulation durch mRNA-stabilitätsmodifizierender Proteine zurückführen lassen könnte. Eine auf diese Weise hervorgerufene Verschiebung des Mengenverhältnisse der einzelnen Untereinheiten könnte zu einer Änderung der Zusammensetzung der resultierenden AP-1-Transkriptionsfaktoren führen und sich so in einem abweichenden Expressionsprofil AP-1-abhängiger Gene äußern.

Da das Auftreten von funktionell relevanten Mutationen oder SNPs in den Promotoren oder den codierenden Regionen der jun- und fos-Gene ebenfalls zu einer veränderten Expression der Gene bzw. zu einer Änderung der biologischen Aktivität der Proteine führen könnte, sollte in diesen genomischen Regionen nach Mutationen/SNPs gesucht werden. Außerdem sollten die Auswirkungen von identifizierten Mutationen mithilfe funktioneller Studien analysiert werden, um die biologische Wirkung der identifizierten Genveränderungen zu klären. Durch diese Analysen sollte geklärt werden, ob sich RA-spezifische Mutationen/SNPs identifizieren lassen, die zu einer vom wt abweichenden Promotor- oder Proteinfunktion führen und so zu einer modifizierten Genexpression bzw. einer pathobiologischen Funktion des betroffenen Proteins beitragen.

Als Abschluß der Arbeit sollte in Zusammenarbeit mit der Firma Clondia Chip Technologies ein DNA-Microarray entwickelt werden, der die Detektion von Mutationen und SNPs im Promotor bzw. der codierenden Region der jun- und fos-Gene (und einzelner SNPs in weiteren Genen wie z. B. TNF α , TNFRII und p53) in einem Hochdurchsatzverfahren ermöglicht. Dabei sollten sowohl die in der Literatur bekannten SNPs und funktionell relevanten Mutationen berücksichtigt werden, als auch die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Basenveränderungen. Dieser Chip sollte zu einem wissenschaftlichen Werkzeug weiterentwickelt werden, das zukünftig zur Analyse potentieller Assoziationen von Mutationen/SNPs mit dem Auftreten oder der Schwere der RA eingesetzt werden kann.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche und unter Berücksichtigung des experimentellen Designs sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist die aus RA- OA- GT- und post mortem NK-Proben isolierte RNA stabil und zur Analyse der mRNA-Expression geeignet?
2. Wird die jun- und fos-mRNA im Vergleich zu den Kontrollen stärker oder schwächer exprimiert?
3. Werden die Jun- und Fos-Proteine im Vergleich zu den Kontrollen stärker oder schwächer exprimiert?
4. Weicht die mRNA- und Proteinexpression der mRNA-stabilitätsmodifizierenden Proteine AUF-1, TTP und HuR in der RA vom Expressionsprofil in den Kontrollen ab?
5. Weisen die codierenden Regionen der Gene junB und junD in der RA Mutationen auf, die zu Veränderungen der AS-Sequenz führen?
6. Weisen die Promotoren der jun- und fos-Gene RA-spezifische Mutationen oder SNPs auf?
7. Lassen sich die Ergebnisse der Mutationsanalyse mit alternativen Methoden reproduzieren und bestätigen?
8. Liegen die Mutationen/SNPs in besonders konservierten (und damit potentiell wichtigen) Genbereichen?
9. Führen die identifizierten Mutationen/SNPs zu einer Modifizierung der biologischen Aktivität der Proteine oder der Funktionsfähigkeit der Promotoren?
10. Kann auf der Grundlage der erhobenen Daten ein DNA-Microarray zur schnellen und unkomplizierten Analyse von Mutationen/SNPs entwickelt und optimiert werden, der in zukünftigen Assoziations-Studien als experimentelles Werkzeug eingesetzt werden kann?

Insgesamt sollte das Verhalten des Transkriptionsfaktors AP-1 und seiner Jun-Komponenten in der RA untersucht und mögliche pathogenetische Wirkungsmechanismen in der RA aufgezeigt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Die Chemikalien und Verbrauchsmittel wurden von den folgenden Firmen bezogen (eine ausführliche Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmitteln befindet sich im Anhang A1 auf Seite xxiv): Active Motif, Agilent Technologies, Ambion, Becton Dickinson, Bio-Rad Laboratories, Biotage, Biowhittaker, Carl Roth, Clontech, Clontech Technologies, Fermentas, Fluka Chemie, Gibco, Hoechst, KPL, Life Technologies, Machery-Nagel, Molecular BioProducts, New England Biolabs, PAA Laboratories, PE Applied Biosystems, Pierce, Promega, Qiagen, Roche Diagnostics und Sigma-Aldrich.

2.1.2 Liste der eingesetzten Antikörper

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Kaninchen-Anti-AUF-1-AK (polyklonal; Katalog-Nummer sc-22368)

Ziege-Anti-Maus-AK (polyklonal, HRP-konjugiert)

Ziege-Anti-Kaninchen-AK (polyklonal, HRP-konjugiert)

DAKO, Hamburg, Deutschland:

Schwein-Anti-Kaninchen-AK (polyklonal, HRP-konjugiert)

Upstate, Charlottesville, VA, USA:

Maus-Anti-HuR-AK (polyklonal; Katalog-Nummer 07-260)

Die polyklonalen Anti-cFos- und Anti-JunB-AK wurden nach dem in (214) beschriebenen Protokoll erzeugt. Der Anti-HuR-AK wurde mir freundlicherweise von Herrn Professor Dr. W. F. C. Rigby zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Liste der eingesetzten Software-Programme

SPSS Inc., Chicago, IL, USA:

SPSS 12.0

Sigma Plot 8.0

2.1.4 Zusammensetzung der eingesetzten Lösungen und Medien

3DNA: 1 x SSC; 250 mM Na₂HPO₄; 4,5% SDS; 1 mM EDTA

Blotting-Puffer: 480 mM Tris; 390 mM Glycin; 20% Methanol

D10F+: DMEM mit 10% FCS; 25 mM HEPES; 100 U/ml Penicillin;

100 µg/ml Streptomycin; 2,5 µg/ml Gentamycin

DNA-Auftragspuffer: 50% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau in TBE

Luria-Bertani-Agar: pro Liter: Agar; 10 g Trypton; 5 g Hefe-Extrakt; 10 g NaCl

Luria-Bertani-Medium: pro Liter: 10 g Trypton; 5 g Hefe-Extrakt; 10 g NaCl

Lysispuffer: Puffer RLT; 1% β-Mercaptoethanol

PBS: 137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 8,09 mM Na₂HPO₄; 1,38 mM K₂HPO₄; pH-Wert: 7,4

SDS-Laufpuffer: 259 mM Glycin; 250 mM Tris; 10 g SDS/l

SSC (20 x): 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH-Wert: 7,0

SSPE (10 x): 1,5 M NaCl; 100 mM NaH₂PO₄; 10 mM EDTA; pH-Wert: 7,4

TBE-Puffer: 89 mM Tris-HCl; 89 mM Borsäure; 25 mM EDTA

TBS: 100 mM Tris; 1,5 M NaCl; pH-Wert: 7,4

TBS/T: 100 mM Tris; 1,5 M NaCl; 0,1 % Triton; pH-Wert: 7,4

2.1.5 Patienten und Gewebeproben

Die SM-Gewebeproben wurden im Rahmen von Gelenkersatzoperationen bzw. arthroskopischen oder offenen Synovektomien in der Orthopädischen Klinik „Rudolf Elle“ (Eisenberg, Deutschland) von insgesamt 45 Patienten mit RA gewonnen. SM-Gewebe von weiteren 48 Patienten mit OA diente als Entzündungskontrolle. Von 10 Patienten mit Gelenktrauma wurde SM-Gewebe entnommen, das als nicht entzündliche Krankheitskontrolle diente. Als nicht entzündliche Normalkontrollen dienten 5 post mortem SM-Proben (Biopsien) von Personen ohne eine rheumatische Erkrankung, die im Pathologischen Institut der Humboldt-Universität (Berlin, Deutschland) entnommen wurden.

Blutproben von jeweils 50 RA- und OA-Patienten wurden in der Abteilung Rheumatologie & Osteologie der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Jena und in der Orthopädischen Klinik „Rudolf Elle“ entnommen. Blutproben von 50 normalen Probanden konnten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Jena gewonnen werden.

Die Patienten und Probanden wurden über die Nutzung der Proben aufgeklärt und haben der Teilnahme an der Studie zugestimmt. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigt (Bearbeitungs-Nr. 0256-5/99 und 1154-07/03).

Nach der SM-Gewebeentnahme wurden die Proben unverzüglich in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach bei –70°C gelagert. Die Blutproben wurden in Heparin-beschichteten Röhrchen bis zu einem Tag bei 4°C gelagert und dann ebenfalls tiefgefroren (-70°C). Die RA-Patienten wurden nach den Kriterien des American College of

Rheumatism (ACR) klassifiziert (215), die OA-Patienten nach den entsprechenden Kriterien für die Osteoarthrose (216). Die klinischen Parameter der Patienten, von denen SM-Gewebe entnommen wurde, sind in Tabelle A1 (Anhang, Seite xxvi) aufgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation und Charakterisierung primärer SFB und Mφ

Um für die Analyse der mRNA-Expression der *jun* und *fos*-Gene SFB und Mφ zu erhalten, die möglichst dem *in vivo*-Phänotyp in der SM entsprechen, wurden aus SM-Gewebe hochreine primäre SFB und Mφ isoliert (Anteil anderer Zellen < 2%; 28). Diese Zellen sind gut zur Analyse geeignet, da frisch gereinigte Zellen auch nach der Isolierung und in Kultur die Heterogenität des synovialen Gewebes zeigen, aus dem sie isoliert wurden (217).

Zu Beginn der Präparation wurden die aus der SM mittels Trypsin- und Kollagenase-Verdau isolierten Zellen für 7 Tage kultiviert; nicht-adhärenente Zellen (u. a. T-Zellen) wurden schon nach 2 Tagen aus der Suspension entfernt, während die adhärenenten SFB und Mφ in Kultur verblieben. Nach den 7 Tagen wurden die Zellen mittels Trypsin gelöst und die SFB durch Negativreinigung mittels AK-gekoppelter Magnetobeads (gegen CD14-Oberflächenmoleküle der Mφ gerichtet) von den Mφ getrennt (28). Um die Reinheit der verschiedenen Zellpopulationen zu überprüfen, wurden sie mittels fluorescence-activated cell sorting (FACS) charakterisiert (218).

Die Zellen wurden mithilfe von DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen [4'-6 Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) oder Bisbenzimid (Hoechst 33258)] auf Kontamination mit Mycoplasmen untersucht. Bei Zellproben, die neben den fluoreszenzmarkierten Zellkernen weitere Fluoreszenzsignale aufwiesen, die auf eine potentielle Kontamination mit Mycoplasmen hindeuteten, wurde zur abschließenden Überprüfung eine Mycoplasmen-spezifische PCR durchgeführt (PCR siehe 2.2.5). Dazu wurden folgende Bedingungen gewählt: degenerierter Primer upstream: CC(A/T)A(C/T)(A/T/C)GTTC(G/T)-(A/T)CCACCTTCACG(A/G)AT, degenerierter Primer downstream: AC(A/T/C)-GG(A/T)GCTGC(A/T/C)CAAATGGA(C/T)GG; PCR-Bedingungen: initiale Denaturierung für 3 min bei 95°C, Denaturierung für 45 s bei 94°C, Annealing für 2 min bei 50°C, Elongation für 2 min bei 72°C; erneute Denaturierung für 1 min bei 94°C, erneutes Annealing für 1 min bei 50°C, erneute Elongation für 2 min bei 72°C; 40 Zyklen. Mycoplasmen-positive Proben wurden verworfen. Die Isolation und Charakterisierung der SFB und Mφ wurde von Frau Dr. E. Kunisch und Frau B. Lanick (AG Experimentelle Rheumatologie) durchgeführt.

2.2.2 RNA- und DNA-Isolierung

2.2.1 RNA-Isolierung aus SM-Gewebe mittels RNeasy Mini Kit

Tiefgefrorene Gewebeproben wurden bei 4°C mit einem Skalpell in Stücke mit einer Gesamtmasse von 20 bis 50 mg zerschnitten. Die gefrorenen Stücke wurden gewogen, mit 350 µl Lysispuffer pro 20 mg Gewebe versetzt, mit einem ULTRA TURRAX Homogenisator homogenisiert und die RNA mithilfe einer RNeasy Mini Säule gemäß den Herstellerangaben isoliert. Die Elution erfolgte mit 50 µl RNase-freiem H₂O.

Um DNA-Kontaminationen zu eliminieren, wurde die isolierte RNA für 15 min bei RT mit RNase-freier DNase I behandelt. Der Erfolg der Behandlung wurde durch eine PCR mit Intron-überspannenden Primern für das Proto-Onkogen c-fos überprüft, die in allen Fällen eine negative Reaktion zeigte (PCR siehe 2.2.5). Eine Positivkontrolle mit humaner genomischer DNA als Template bestätigte dabei das grundsätzliche Funktionieren der PCR. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Primer upstream: CCGAGCGCAGAGCATTGGCAG, Primer downstream: TCCCTCCTCCGGTTGCGGC-ATT; PCR-Bedingungen: initiale Denaturierung für 3 min bei 95°C, Denaturierung für 45 s bei 95°C, Annealing für 45 s bei 61,4°C, Elongation für 1 min bei 72°C; 35 Zyklen.

Eine mögliche Degradierung der RNA wurde durch eine Analyse der Proben mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (siehe 2.2.2.2) oder durch Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen überprüft. Das Auftreten der beiden distinkten 18S- und 28S-ribosomalen (r)RNA-Banden und die Abwesenheit eines auf Degradation hinweisenden „Schmiers“ im Gel zeigte in allen Fällen die gute Stabilität der RNA. Die RNA-Konzentration wurde mit einem Agilent 2100 Bioanalyzer (siehe 2.2.2.2) oder anhand der Absorption eines RNA-Aliquots mit einem Spektrophotometer bei 260 nm Wellenlänge bestimmt. Ein Verhältnis der optischen Dichte (OD) bei 260 nm (OD_{260 nm}) zur OD bei 280 nm (OD_{280 nm}) von ca. 2,0 belegte in allen Fällen eine minimale Proteinkontamination der RNA-Präparation.

2.2.2.2 Kontrolle der RNA-Qualität

Die Qualität der für die mRNA-Expressionsanalysen eingesetzten RNA-Proben wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Bruno Stuhlmüller (Klinik für Innere Medizin, Abteilung Rheumatologie und Klinische Immunologie, Charité, Humboldt-Universität Berlin) mithilfe eines Agilent 2100 Bioanalyzers überprüft.

Der Agilent 2100 Bioanalyzer basiert auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese zur Auftrennung unterschiedlich großer Moleküle mithilfe elektrischer Spannung, die von einer Reihe unabhängiger Elektroden erzeugt und computergesteuert kontrolliert wird. Mit diesem Instrument können bis zu zwölf verschiedene Proben und eine Molekulargewichtsstandard gleichzeitig aufgetrennt, quantifiziert und die Größe verschiedener Moleküle in den einzelnen Proben bestimmt werden. Diese Auftrennung wird in Microarrays durchgeführt, die aus einer

Glasgrundfläche bestehen. Die Probenreservoirs sind mit den Kapillaren verbunden, durch die sich die Proben während der Elektrophorese bewegen. Die Reservoirs werden mit einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff gefüllt, der in die Proben auf ihrem Weg durch die Kapillare interkaliert. Als Trägermaterial für den Farbstoff dient dabei ein lineares Polymer (219).

Die Ergebnisse werden dann als Elektropherogramme und computergenerierte Gelbilder dargestellt. Im Falle der RNA-Analyse kann im Gel die 18S- und 28S-rRNA nachgewiesen werden. Die Größe der aufgetrennten RNA-Moleküle wird dabei anhand des Molekulargewichtsstandard bestimmt, die Konzentration der analysierten Probe hingegen anhand von „spike controls“ mit bekannten RNA-Konzentrationen, die jeder Probe zugesetzt werden (220). In den Elektropherogrammen erscheinen die nachgewiesenen 18S- und 28S-rRNA-Banden als Peaks. Distinkte Peaks mit geringem Hintergrundsignal dienen dabei als Qualitätsmerkmal.

Für die hier genannten Untersuchungen wurde neben dem Agilent 2100 Bioanalyzer der RNA 6000 LabChip Kit eingesetzt. Es wurden (exemplarisch für alle Proben) zufällig ausgewählte Proben aus allen Patientengruppen untersucht (NK: n=3, GT: n=3, OA: n=6, RA: n=6). In allen Fällen war die gemessene RNA-Konzentration ≥ 50 ng/ μ l und die Proben zeigten keine Anzeichen von RNA-Degradation.

2.2.2.3 Synthese von cDNA mittels reverser Transkription

Je 2 μ g Gesamt-RNA wurden mit 20 pmol Oligo-(dT)-Primer versetzt und der Ansatz mit RNase-freiem H₂O auf 12 μ l aufgefüllt. Eine Inkubation für 10 min bei 70°C ermöglichte die Primer-Anlagerung. Anschließend wurden 4 μ l 5 x First-strand-buffer, 2 μ l DTT, je 25 mM dNTPs und 200 Units Superscript II Reverse Transcriptase bei 4°C zugesetzt. Die reverse Transkription erfolgte beim Temperaturoptimum der Reversen Transcriptase (42°C) während einer Inkubation für 50 min, an die sich eine erneute Inkubation zum Abbruch der Reaktion (70°C, 10 min) anschloß. Nach der Reaktion wurde die synthetisierte cDNA entweder bei -20°C gelagert oder direkt für die PCR eingesetzt. Die DNA-Konzentration wurde anhand der Absorption eines DNA-Aliquots mit einem Spektrophotometer bei 260 nm Wellenlänge bestimmt. Ein OD_{260 nm} zu OD_{280 nm} Verhältnis von ca. 1,8 belegte in allen Fällen eine minimale Proteinkontamination des Ansatzes.

2.2.2.4 DNA-Isolierung aus SM-Gewebe mittels QIAamp Mini Kit

Das Gewicht eines aufgetauten SM-Gewebestücks wurde bestimmt, das Stück mit einer Schere zerteilt und in einem Röhrchen mit 80 μ l PBS pro 25 mg Gewebe versetzt. Die Homogenisierung und Lyse des Gewebes erfolgte mit dem ULTRA TURRAX Homogenisator. Anschließend wurde die DNA gemäß dem QIAamp Mini Kit Handbuch über eine Säule gereinigt. Die Elution der DNA erfolgte mit 200 μ l H₂O. Die isolierte DNA wurde

entweder bei -20°C gelagert oder direkt für die PCR eingesetzt. Die DNA-Konzentration wurde anhand der Absorption eines DNA-Aliquots bestimmt.

2.2.3 Klonierung

Die in dieser Arbeit benötigten Plasmide wurden in den *Escherichia coli*-Stamm TG1 transformiert und auf diese Weise vervielfältigt. Der *E. coli*-Stamm TG1 ist gegenüber dem Wildtyp wie folgt modifiziert: *supE hsd Δ 5 thi Δ (lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15]*. Diese Veränderungen dienen insbesondere der „Blau/Weiß-Selektion“ nach pUC19-Transformation, da die teilweise deletierte β -Galactosidase des TG1 durch das α -Peptid des pUC19 komplettiert werden kann.

2.2.3.1 Herstellung von Plasmidkonstrukten zur Transformation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Plasmidkonstrukte benötigt, die für folgende Zwecke eingesetzt wurden:

1. als Positivkontrolle für die Mutationsanalyse,
2. zur Sequenzierung der *jun*- und *fos*-Promotoren,
3. als Standard für die *jun*- und *fos*-, bzw. HuR-, TTP- und AUF-1-mRNA-Expressionsanalyse oder
4. als Reportergenkonstrukt für die funktionelle Analyse der *jun*- und *fos*-Promotoren.

Dabei wurden Amplifikate der jeweiligen Sequenz entweder in das Plasmid pUC19 (1.-3.) oder in pUBT-luc (4.) inseriert.

Die Insertion von PCR-Produkten, die von Bindungsstellen für Restriktionsenzyme flankiert wurden, in das Plasmid pUC19 erfolgte dabei über die Schnittstellen der Enzyme *Eco* RI und *Bam* HI. Für die Insertion der Amplifikate in das Plasmid pUBT-luc (221) dienen die Schnittstellen der Enzyme *Hind* III und *Not* I. Dabei wurden jeweils 10 U *Eco* RI und 5 U *Bam* HI in einem 20 μl Restriktionsansatz (inkl. 2 μl 10 x Reaktionspuffer, 15 μl DNA-Fragment und 2 μl H₂O) oder 20 U *Not* I und 30 U *Hind* III in einem 40 μl Restriktionsansatz eingesetzt (inkl. 4 μl 10 x Reaktionspuffer, 4 μl bovines Serumalbumin und 30 μl DNA-Fragment). Der Restriktionsverdau erfolgte jeweils über Nacht bei 37°C . Für die Ligation der gespaltenen Fragmente in die mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen Plasmide wurden jeweils 4 μl 10 x Ligasepuffer, 4 μl gespaltenes Plasmid, 28 μl gespalte DNA-Fragmente und 4 U Ligase in einem 40 μl Ligationsansatz eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 11°C .

2.2.3.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (222) wurde eine Einzelkolonie des *E. coli*-Stammes TG1 in 1 ml Luria-Bertani- (LB-) Medium inkl. 20 µg Ampicillin (Amp) bei 37°C über Nacht (ca. 15 h) unter regelmäßigem Schütteln kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen in einen Kolben mit 100 ml LB-Medium inkl. 200 µg Amp überführt und erneut bei 37°C unter regelmäßigem Schütteln inkubiert. Nach 1 h wurde damit begonnen, die OD der Kultur in halbstündigen Abständen zu überprüfen. Nach Erreichen einer OD von 0,7 bei 600 nm wurde die Inkubation abgebrochen, da aufgrund der OD-Messung davon ausgegangen werden konnte, daß sich die Kultur in der - für die Herstellung kompetenter Zellen günstigen - logarithmischen (log) Wachstumsphase befand. Nach Abkühlung der Kultur auf 4°C wurde sie in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellen für 7 min bei 4°C mit 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet mit 30 ml eisgekühlter 100 mM MgCl₂-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (10 min bei 4°C mit 800 rcf), das Pellet in 30 ml eisgekühlter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und die Lösung für 20 min in einem Eiswasserbad inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation unter letztgenannten Bedingungen wurden die Zellen in 5 ml eisgekühlter 100 mM CaCl₂/15% Glycerin-Lösung resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

3.2.3.3 Transformation der *E. coli*-Zellen

Für die Transformation aller beschriebenen Plasmide wurden 100 µl der aufgetauten, kompetenten Zellen mit 10 µl des Plasmides versetzt. Zur Kontrolle der Transformation wurden jeweils 100 µl der Zellen entweder mit 1 µl pUC 19 (Positivkontrolle) vermischt oder ohne weitere Behandlung als Negativkontrolle eingesetzt. Nach 1 h Inkubation bei 4°C und anschließendem 2-minütigen Hitzeschock bei 42°C wurden sie erneut auf 4°C abgekühlt und schließlich nach Zugabe von 1 ml LB-Medium inkl. 20 µg Amp für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Ausplattierung der Ansätze auf ampicillinhaltige (20 µg/ml) LB-Agar-Platten. Die Platten wurden dann über Nacht (ca. 15 h) bei 37°C inkubiert. Die positiven Kolonien wurden mittels steriler Plastikstempel von den Platten isoliert, in 100 ml LB-Medium inkl. 20 µg Amp über Nacht bei 37°C vermehrt und standen dann für die Plasmid-Isolierung zur Verfügung (siehe 2.2.3.4).

2.2.3.4 Plasmidisolierung mit der „Miniscreen“-Methode nach Birnboim und Doly

Zur Identifizierung von plasmidhaltigen *E. coli*-Kolonien wurden aus den gebildeten Kolonien die Plasmide isoliert und letztere durch eine Restriktionsspaltung bezüglich des Vorhandenseins der integrierten Sequenz überprüft. Für diese Plasmidisolierung wurde aufgrund der hohen Probenanzahl die „Miniscreen“-Methode nach Birnboim und Doly

gewählt (223). Die DNA-Konzentration wurde anhand der Absorption eines DNA-Aliquots bestimmt.

2.2.3.5 Spaltung der isolierten Plasmide mittels Restriktionsendonukleasen

Die isolierten Plasmide wurden mittels Restriktionsendonukleasen-vermittelter Spaltung bezüglich der Anwesenheit der gewünschten Sequenz überprüft. Die Spaltungen erfolgten in Ansätzen mit jeweils 20 µl Volumen: 2-4 µl Plasmid-DNA, 2 µl 10 x Restriktionspuffer und 1 µl eines oder mehrerer Restriktionsenzyme (in Abhängigkeit vom Plasmid und der inserierten Sequenz wurden verschiedene Restriktionsenzyme eingesetzt: *Eco* RI, *Bam* HI, *Hind* III, *Not* I, *Rsa* I); das Restvolumen bestand aus destilliertem Wasser. Die Ansätze wurden für 4 h bei 37°C inkubiert und anschließend für 15 min bei RT mit 1 µl RNase behandelt, um verbleibende bakterielle RNA zu entfernen. Nach Abschluß der Spaltung wurden jeweils 5 µl der Ansätze mit Hilfe eines 1,2%-igen Agarose-Gels analysiert (siehe 2.2.15). Nach der Identifikation einer *E. coli*-Kolonie mit einem integrierten Plasmid inkl. der gewünschten Sequenz wurde die Sequenz mittels Sequenzierung bestätigt (Sequenzierung siehe 2.2.16) und die Kolonie weiterverarbeitet.

2.2.3.6 Plasmidisolierung mittels Nucleobond PC 100 Kit

Um die Plasmide in einer für die weiteren Anwendungen ausreichenden Menge und Reinheit zu erhalten, wurde eine Plasmidpräparation im Midi-Maßstab mit Hilfe des Nucleobond PC 100 Kits durchgeführt. Die Präparation erfolgte gemäß den Herstellerangaben über eine Nucleobond PC 100-Säule. Nach der Elution wurde die isolierte Plasmid-DNA mit 11 ml Isopropanol gefällt, für 30 min bei 4°C mit 12000 g zentrifugiert und einmaligem Waschen mit 70%-igem Ethanol in 500 µl H₂O gelöst. Die DNA-Konzentration wurde anhand der Absorption eines DNA-Aliquots bestimmt.

2.2.3.7 Plasmidisolierung mittels Nucleospin Plus Kit

Um die verschiedenen Plasmide in einer für die Sequenzierung benötigten Reinheit aus der identifizierten Kolonie zu isolieren, wurde die Plasmid-Isolierung mit Hilfe des Nucleospin Plus Kits durchgeführt. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mittels Nucleospin Plus-Säulen gemäß den Angaben im Handbuch. Die Elution erfolgte durch Zentrifugation mit 30 µl H₂O für 1 min bei RT mit 15700 rcf. Zusätzlich wurde aus einer weiteren über Nacht inkubierten Kultur der gleichen Kolonie eine Glycerinkultur - bestehend aus 500 µl Glycerin und 500 µl der Kultur - hergestellt und diese bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Die DNA-Konzentration wurde anhand der Absorption eines DNA-Aliquots bestimmt.

2.2.3.8 Endotoxinfreie Plasmidisolierung mit dem NucleoBond PC 500 EF Kit

Um endotoxinfreie Plasmide zu isolieren, die eine für die Transfektion (siehe 2.2.14) ausreichende Reinheit aufwiesen, wurde der NucleoBond PC 500 EF Kit eingesetzt. Dazu wurden 100 ml einer über Nacht bei 37°C kultivierten Bakterienkultur, die das zu isolierende Plasmid enthielt, lysiert und mithilfe einer Nucleobond PC 500 EF-Säule isoliert. Nach der Elution wurde die endotoxinfreie Plasmid-DNA mit 3,5 ml Isopropanol präzipitiert und für 30 min bei 12°C mit 15000 rcf zentrifugiert wurde. Das entstandene Plasmid-Pellet wurde mit 2 ml endotoxinfreiem 70%-igem Ethanol gewaschen (10 min, RT, 15000 rcf), getrocknet und schließlich für 1 h mit 250 µl endotoxinfreiem Wasser unter Schütteln gelöst. Die isolierte, endotoxinfreie Plasmid-DNA wurde dann bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.3.9 Fällung der Plasmide

Um eine für die Transfektion ausreichende Reinheit der pUBT-luc-Vektoren zu garantieren, wurden diese nach der endotoxinfreien Isolierung ein weiteres Mal durch eine Natriumazetat-Ethanol fällung gereinigt. Dabei wurde den in 250 µl endotoxinfreiem Wasser gelösten Plasmiden 32 µl einer 3M Natriumazetat-Lösung (pH = 4,8) und 500 µl Ethanol (100%-ig) zugesetzt. Die Plasmide wurden für 18 h bei -20°C gefällt, anschließend für 15 min bei RT und 15000 rcf abzentrifugiert und nach zweimaligem Waschen mit jeweils 200 µl 70%-igem Ethanol bei RT getrocknet. Die Lösung erfolgte in 250 µl endotoxinfreiem Wasser. Die DNA-Konzentration wurde anhand der Absorption eines DNA-Aliquots bestimmt.

2.2.4 Präparation von Kern- und Zellextrakten

Zur Gewinnung der zur Analyse der *Jun*- und *Fos*-Proteinexpression nötigen Proteinisolate wurden Kernextrakte aus SM-Gewebeproben präpariert. Die zur Analyse der AUF-1-, TTP- und HuR-Proteinexpression benötigten Zellextrakte wurden ebenfalls aus SM-Gewebeproben isoliert. Die Kern- und Zellextraktion erfolgte jeweils mit dem Active Motif Nuclear Extract Kit gemäß den Herstellerangaben. Die Zell- oder Kernextrakte wurde nach der Präparation entweder sofort für die Proteinbestimmung eingesetzt oder bei -70°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Bicinchoninsäure- (BCA-) Assay (224). Nach der Bestimmung wurden die einzelnen Proben auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt.

2.2.5 Die konventionelle Polymerase-Ketten-Reaktion

Die konventionelle Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase-chain-reaction, PCR) beruht auf der exponentiellen *in vitro*-Replikation eines zu amplifizierenden DNA-Fragmentes mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase (z. B. *Taq*-Polymerase; 225) und synthetisch hergestellter Oligonukleotide („Primer“; 226;227). Die optimalen Annealing-Temperaturen

der für die verschiedenen Amplifikations-Reaktionen eingesetzten Primerpaare wurden durch Gradienten über ein Temperaturspektrum von ca. 20°C ermittelt. Die Spezifität der Reaktion wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.15) und Sequenzierung der amplifizierten Fragmente (siehe 2.2.16) bestätigt.

2.2.5.1 Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR wurde in Ansätzen mit einem Volumen von jeweils 25 oder 50 µl durchgeführt. In den Ansätzen waren enthalten: 2-5 µl DNA, je 200 ng beider Primer, je 0,2 mM dNTPs, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10% DMSO und 2,5 oder 5 Units *Taq*-DNA-Polymerase. Die Ansätze wurden mit H₂O auf das entsprechende Endvolumen aufgefüllt. In jedem Experiment wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die an Stelle des DNA-Templates nur H₂O enthielt.

Für die Synthese der DNA-Fragmente, die als Probe bei der DNA-Microarray-basierten Mutationsanalyse dienten (siehe 2.2.13), wurden in 50 µl Ansätzen 20 µl DNA (isoliert aus Blut) als Template sowie 2,5 µM biotinyliertes dUTP eingesetzt. Zusammensetzung und Konzentration der anderen Reagenzien wurden nicht verändert.

Für die Synthese der DNA-Fragmente, die als Template beim Pyrosequencing dienten, wurde jeweils 1 biotinylierter Primer eingesetzt.

Die genspezifischen PCR-Bedingungen (neben der immer vorgenommenen initialen Denaturierung der DNA für 5 min bei 95°C) können den Tabellen A2 bis A5 (Anhang, Seite xxviii-xxxiii) entnommen werden.

2.2.5.2 Reinigung von PCR-Produkten mittels QIAquick Purification Kit

Um die für sensitive Anwendungen - wie z. B. die direkte Sequenzierung - benötigte Reinheit der PCR-Produkte zu garantieren, wurden diese mit Hilfe des QIAquick Purification Kits gemäß Vorschrift gereinigt. Der Erfolg der Fragment-Reinigung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe 2.2.15).

2.2.6 Die „real-time“ Polymerase-Ketten-Reaktion

Der „real-time“ PCR liegt das gleiche Prinzip der exponentiellen DNA-Amplifikation zugrunde wie der konventionellen PCR, allerdings kann die Entwicklung der DNA-Amplifikation in der „real-time“ PCR noch während des laufenden Versuches („online“) beobachtet werden. Diese Neuerung beruht auf der Markierung der bereits amplifizierten dsDNA-Produkte mit einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, der nur an dsDNA bindet, z.B. SYBR-Green oder Ethidiumbromid (228), oder sequenzspezifischen und fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden, wie z.B. „Taq-man“ (229). Diese Produktsynthese während der Amplifikation ist dabei von der initialen Template-Konzentration (c) in der entsprechenden Kapillare abhängig. Dabei steigt die Fluoreszenz proportional zum $\log c$ des Templates an. Ein weiteres Merkmal der „real-time“ PCR ist die wesentliche zeitliche Verkürzung aller Schritte des Amplifikationsprotokolls, welche den insgesamt erforderlichen zeitlichen Aufwand für „real-time“ PCR-Versuche trotz einer Erhöhung der benötigten Zyklenzahl deutlich reduziert.

Für die Quantifizierung der einzelnen Gene muß eine externe Standardkurve generiert werden. Dies geschieht durch Amplifikation und Fluoreszenzmessung von zehnfachen Verdünnungen eines Plasmides oder eines konventionellen PCR-Produktes in bekannter Konzentration, welches eine definierte Anzahl von Kopien des entsprechenden Gens enthält. Nach Ende der PCR wird durch die Software des „real-time“ PCR Thermocyclers eine Standardkurve generiert, welche die Abhängigkeit des $\log c$ von dem Amplifikationszyklus zeigt, in welchem die detektierte Fluoreszenz zum ersten Mal ein definiertes Schwellenniveau überschreitet. Dieser Zyklus wird als „Threshold“-Zyklus der entsprechenden Ausgangskonzentration bezeichnet. Die Anzahl der Kopien des gesuchten Gens in Proben unbekannter Konzentration wird quantifiziert, indem der Threshold-Zyklus dieser Proben mit den Threshold-Zyklen der externen Standardkurve verglichen wird.

In dieser Studie wurde aus Gründen der universellen Einsatzbarkeit der nicht sequenzspezifische Interkalator SYBR-Green als Fluoreszenzmarker gewählt. SYBR-Green interkaliert in die kleine Furche der DNA und ist sehr stabil (nur 6% Aktivitätsverlust nach 30 Amplifikationszyklen). Die Reaktionen wurden in einem LightCycler (Roche Diagnostics) durchgeführt. Die Heizgeschwindigkeit zwischen den einzelnen PCR-Schritten betrug in allen Fällen 20°C/s (mit Ausnahme der Schmelzkurvenanalyse).

2.2.6.1 „Real-time“ PCR

Die „real-time“ PCR wurde in Ansätzen mit jeweils 20 µl Volumen durchgeführt. In den Ansätzen waren enthalten: Verschiedene Konzentrationen eines externen Standards (siehe 2.2.7) oder der cDNA (Probenvolumen: 1 µl), je 200 ng beider Primer, 2 µl „10 x Fast start reaction mix“ (enthält eine modifizierte, erst bei 95°C aktivierte „hot-start“ *Taq*-Polymerase;

dNTPs; 10 mM MgCl₂ und SYBR-Green) sowie weitere 2 µl MgCl₂ (Endkonzentration: 3,6 mM). Die Ansätze wurden mit H₂O aufgefüllt. In jedem Experiment wurde eine Negativkontrolle (mit H₂O statt eines Templates) mitgeführt.

Die Primersequenzen und genspezifischen PCR-Bedingungen (neben der immer vorgenommenen initialen Denaturierung der DNA und Aktivierung der Taq-DNA-Polymerase für 3 min bei 95°C) können der Tabelle A6 (Anhang, Seite xxxiv) entnommen werden. Die Spezifität der Reaktion wurde neben der im Programm installierten Schmelzpunktbestimmung der PCR-Produkte auch durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.15) und Sequenzierung der amplifizierten Fragmente (siehe 2.2.16) bestätigt.

2.2.6.2 Normalisierung der mRNA-Konzentration in den einzelnen Proben

Zur Normalisierung der einzelnen Proben auf den gleichen cDNA-Gehalt wurde die experimentelle Normalisierung der cDNA-Konzentration mittels „real-time“ PCR gewählt (40). Diese erfolgte durch eine tatsächliche Verdünnung der Proben anhand von Verdünnungsfaktoren. Diese Faktoren wurden durch die Quantifizierung des mRNA-Gehaltes des housekeeping-Gens Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in den Proben mittels „Real-time“ PCR ermittelt. Die Proben wurden durch insgesamt drei GAPDH-PCR mit anschließender Korrektur der Verdünnungsfaktoren auf einen fast vollständig übereinstimmenden cDNA-Gehalt normalisiert. Verbleibende marginale Abweichungen wurden zusätzlich mathematisch korrigiert. Die Parameter der GAPDH-PCR sind der Tabelle A5 (Anhang, Seite xxxii) zu entnehmen.

2.2.7 Herstellung der externen Standards und der Standardkurven

Als externe Standards dienten Plasmide, in die eine entsprechende Ziel-DNA-Sequenz mittels Klonierung inseriert worden waren. Diese Plasmide wurden in zehnfachen Verdünnungen der bekannten Ausgangskonzentrationen für die Generierung der externen Standardkurven eingesetzt. Die Versuche zur Bestimmung des Threshold-Zyklus der jeweiligen Verdünnungsstufe wurden mit denselben Primern durchgeführt, die auch in den späteren Versuchen mit den unbekannten Proben eingesetzt wurden. Die definierten Konzentrationen der externen Standards sowie der detektierte cDNA-Gehalt in den einzelnen Proben wurden in „relativen Einheiten“ angegeben.

Im Fall von junD diente das Plasmid “RSV-JunD” (mit der kompletten junD-Sequenz; 93) als externer Standard. Für alle anderen Gene wurde die komplette codierende Gensequenz bzw. der im jeweiligen Fall mittels „real-time“ PCR zu amplifizierende Gen-Abschnitt in den Vektor pUC19 kloniert. Die korrekte Sequenz aller eingesetzten Plasmide wurde mittels Sequenzierung bestätigt (siehe 2.2.16)

2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

Zur Bestimmung der Proteinexpression von AUF-1, TTP und HuR wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließendem Western-Blot eingesetzt. Dabei wurden in der SDS-PAGE die Proteine aus den verschiedenen, auf die gleiche Gesamtproteinkonzentration eingestellten Proben (siehe 2.2.4.3) der Größe nach aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurden die Proteine mittels Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran überführt und das gewünschte Protein wurde mit einem spezifischen primären AK markiert. Die Detektion der primären AK erfolgte mit einem Meerettich-Peroxidase- (HRP-) gekoppelten sekundären AK, der nach Zugabe von HRP-Substratlösung eine Chemolumineszenz erzeugte, die mithilfe von Photofilmen quantifiziert werden konnte.

2.2.8.1 Bestimmung der AUF-1-, TTP- und HuR-Proteinexpression mittels Western-Blot

Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden über 1,5 mm dicke SDS-Polyacrylamidgele (bestehend aus einem 10%-igen Trenngel- und einem 4,5%-igen Sammelgelabschnitt) in einer Mini-Protean II-Apparatur aufgetrennt. Dazu wurden 10 bis 20 µl der durch Verdünnung auf einen annähernd gleichen Gesamtproteingehalt normalisierten Proben mit 1/5 Volumen 5x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Geringe Unterschiede im Gesamtproteingehalt der Proben wurden bei der Auswertung mathematisch korrigiert. Nach der Überführung der Probenansätze in die Geltaschen mit einer Hamilton-Spritze wurde die Elektrophorese für 1,5 bis 2 h bei 30 mA durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten 5 µg Protein aus einem Kernextrakt PMA-stimulierter K4IM-Zellen (230).

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele mithilfe des Mini-Protean II Tank Blotting Systems über 45 min bei 400 mA auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Danach wurde die Membran mit 5%-iger Magermilchlösung (in TBS) für 1 h bei RT blockiert und nach dreimaligem Waschen mit TBS/T über Nacht bei 4°C mit 5 ml primärem AK inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Membran für 2 h mit 10 ml des sekundären, HRP-konjugierten AK inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde die Membran für 3 bis 5 min mit 1 ml SuperSignal Pico West-Lösung oder, bei geringen Proteinkonzentrationen, mit SuperSignal Femto West-Lösung inkubiert. Die entstehenden Chemolumineszenz-Signale wurden schließlich durch Belichtung eines Films für 1 bis 10 min in einer Autoradiographie-Kassette detektiert.

Für HuR, AUF-1 und TTP fanden die folgenden AK Verwendung: Ein polyklonaler Maus-Anti-HuR-AK (1:250 in 5% Milch-TBS/T), ein polyklonaler Kaninchen-Anti-AUF-1-AK (1:500 in 5% Milch-TBS/T) und ein polyklonaler Kaninchen-Anti-TTP-AK (1:2500 in 5% Milch-TBS/T; 173).

2.2.9 Enzyme-linked immuno sorbent assay

Der enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA; 231) zur Bestimmung der *Jun*- und *Fos*-Proteinexpression beruht auf der Bindung von in Kernextrakten enthaltenen AP-1-Komplexen an AP-1-Konsensus-DNA-Sequenzen, die am Boden von 96-Loch-Platten immobilisiert wurden. Nach der Bindung der AP-1-Komplexe wurden die einzelnen Untereinheiten mit einem primären AK gegen cJun, JunB, JunD oder cFos markiert. Die gebundenen primären AK wurden dann mit einem HRP-gekoppelten sekundären AK markiert. Die spezifische Menge der in den gebundenen AP-1-Komplexen enthaltenen Untereinheiten konnte dann durch die Zugabe von HRP-Peroxidase-Substratlösung (Tetramethylbenzidin, TMB) und die Auswertung der entstehenden Farbentwicklung bestimmt werden.

2.2.9.1 Bestimmung der *Jun*- und *Fos*-Proteinexpression mittels ELISA

Zur Analyse der Proteinexpression der Jun- und Fos-Proto-Onkoproteine in SM-Gewebe wurde der Gehalt an cJun, JunB, JunD und cFos mithilfe von ELISA-basierten Kit-Systemen in RA-SM (n = 13), OA-SM (n = 13), GT-SM (n = 6) und NK-SM (n = 5) analysiert. Für JunB, JunD und cFos wurde der Active Motif TransAM AP-1 Family Kit eingesetzt, für cJun der BD Mercury TransFactor cJun Kit.

Beim Active Motif TransAM AP-1 Family Kit wurden die Löcher in der Platte zuerst mit 30 µl Bindungspuffer versetzt, dann 20 µl der Proteinlösung hinzugefügt (zwischen 2 und 20 µg; Positivkontrolle: 5 µg Protein aus WI-38 Kernextrakt oder Kernextrakt aus PMA-stimulierten K4IM-Zellen; 230) und diese Ansätze für 1 h bei RT und 100 rpm inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit 200 µl Waschpuffer wurden 100 µl des jeweils benötigten primären AK hinzugefügt (alle 1:100 verdünnt in AK-Bindungspuffer) und die Lösung für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 200 µl Waschpuffer erfolgte die Zugabe des sekundären HRP-konjugierten AK (1:100 in AK-Bindungspuffer). Die Inkubation bei RT wurde nach 1 h durch viermaliges Waschen beendet; anschließend wurden zu jedem Ansatz 100 µl Entwicklungslösung gegeben und die Farbentwicklung nach 20 min (inkubiert in Dunkelheit bei RT) mit 100 µl „Stop“-Lösung abgebrochen. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Absorption im Spektrophotometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 655 nm).

Ein entsprechendes Vorgehen wurde auch bei der Durchführung mit dem BD Mercury TransFactor cJun Kit angewandt, wobei folgende Abweichungen zum anderen Kit-System auftraten: 1. Die Löcher der Platte wurden mit 150 µl TransFactor-Puffer (mit Blocking-Reagenz) für 15 min bei RT vorinkubiert, bevor dieser entfernt wurde und 50 µl des Kernextraktes (bis zu 30 µg) eingesetzt wurden. 2. Der primäre AK wurde 1:50 in

TransFactor-Puffer mit Blocking-Reagenz verdünnt; der sekundäre AK 1:100 in TransFactor-Puffer mit Blocking-Reagenz. 3. Anstelle von „Stop“-Lösung wurde 1 M H₂SO₄ eingesetzt.

2.2.10 Immunhistologie

Immunhistologische Untersuchungen wurden eingesetzt, um in RA-, OA- und GT-SM-Proben die Expression der Proteine cFos und JunB in der Deckzellschicht, diffusen Infiltraten, fibrösen Gebieten und an der Knorpel-Pannus-Grenze zu untersuchen. Dazu wurden Kryostat-Schnitte von Gelenkproben und das in (40) beschriebene Protokoll genutzt. Diese Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Dr. R. W. Kinne und Frau B. Ukena (AG Experimentelle Rheumatologie).

Die Kryostat-Schnitte wurden luftgetrocknet und für 10 min in Azeton und Chloroform bei RT fixiert. Die Inkubation mit den Anti-cFos- und Anti-JunB-AK (1:50 bis 1:100 verdünnt in TBS/1% humanem Serum) erfolgte für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer. Nach einmaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit einem sekundären, HRP-gekoppelten Schwein-Anti-Kaninchen-AK (1:40 verdünnt in TBS/20% humanem Serum) für 30 min bei RT. In der anschließenden enzymatischen Reaktion wurde als HRP-Substrat eine gefilterte Diaminobenzidin-Lösung eingesetzt (5 g, gelöst in 10 ml PBS mit 3% H₂O₂). Die Gegenfärbung der Zellkerne wurde mit Mayer's Hämatoxylin durchgeführt.

Bei den Negativkontrollen wurde das gleiche experimentelle Vorgehen gewählt, wobei die primären AK aber durch identische Konzentrationen von Kaninchen-IgG ersetzt wurden. Beim Einsatz dieser Kontrollen wurde in keinem Fall eine Färbung beobachtet.

2.2.11 Der Non-Isotopic RNase Cleavage Assay

Die Analyse von Mutationen und SNPs der codierenden Region der Gene junB und junD und der Promotorregionen der jun- und fos-Gene erfolgte nach der Methode des „Non-Isotopic RNase Cleavage Assay“ (NIRCA) (232;233). Dieser basiert auf der spezifischen Spaltung von Fehlpaarungen („Mismatches“) zwischen zwei RNA-Strängen durch RNasen mit einer Spezifität für Einzelstrang (ss)DNA. Dazu werden konventionell hergestellte PCR-Fragmente (siehe 2.2.5.1) einer Wildtyp- (wt-) Probe des Gens und der verschiedenen zu untersuchenden Gewebeproben hergestellt, die an ihren 5'-Termini über T7-RNA-Polymerase-Promotoren verfügen (eingeführt über die PCR-Primer). Von diesen Fragmenten werden sowohl homo-, als auch heterogene Gemische hergestellt (wt-/wt-Fragment und Probe-/Probe-Fragment, bzw. wt-/Probe-Fragment), die mittels *in vitro*-Transkription durch die T7-RNA-Polymerase in RNA transkribiert werden. Nach der Transkription werden die (zueinander komplementären) RNA-Einzelstränge denaturiert - um potentiell störende Sekundärstrukturen zu eliminieren - und schließlich (nach Zugabe eines die Hybridisierung fördernden Puffers) miteinander hybridisiert. Im Falle der homogenen Ansätze aus reinen wt- oder reinen Probe-RNA-

Strängen entstehen aufgrund der Anwesenheit nur einer RNA-Spezies in der Reaktionslösung ausschließlich Homoduplices. Da im Falle des heterogenen wt-/Probe-Gemisches allerdings zwei RNA-Spezies anwesend sind, entstehen neben den Homoduplices auch Heteroduplices aus einem wt- und einem Proben-RNA-Strang. Werden diese Homo- und Heteroduplices nun mit einem speziellen RNase-Gemisch behandelt, werden die Homoduplices nicht gespalten, da es in ihnen aufgrund ihrer absoluten Komplementarität nicht zu Fehlpaarungen gekommen ist. Sind in der DNA- bzw. RNA-Sequenz der Probe allerdings Unterschiede zur wt-Sequenz vorhanden - z. B. Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen - wirken sich diese in Fehlpaarungen zwischen dem wt- und dem Proben-RNA-Strang aus, die durch das RNase-Gemisch gespalten werden können. Die Produkte dieses RNase-Verdau können nun in einem Agarose-Gel nachgewiesen werden.

2.2.11.1 Detektion von Mutationen mittels MutationScreener

Für die Detektion potentieller Mutationen wurde der MutationScreener eingesetzt, der auf dem oben beschriebenen Prinzip des NIRCA beruht. Untersucht wurden die codierenden Regionen von junB und junD bzw. ca. 1,8 kb der Promotoren (inklusive der 5'-UTR) der jun- und fos-Gene (aufgeteilt in zwei Promotorabschnitte für die jun-Gene und vier Promotorabschnitte für cfos) in jeweils 10 RA-, 10 OA- und 5 GT/NK-Proben (im Falle des junD-Promotorabschnitts II: n = 5 für RA/OA und n = 3 für GT/NK).

Die synthetisierten PCR-Fragmente der Proben, des wt und der Positivkontrolle wurden durch Verdünnung auf einen identischen DNA-Gehalt normalisiert. Die Äquivalenz der DNA-Konzentrationen wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.15) und UV-Absorptionsmessung bestätigt.

Die Transkription wurde in Ansätzen mit jeweils 6 µl Volumen durchgeführt und erfolgte durch eine einstündige Inkubation bei 37°C. In den Ansätzen waren enthalten: 1-2 µl Fragment (bzw. je 0,5-1 µl bei wt-/Proben-Gemischen), 1,2 µl von einem 2,5 mM rNTP-Mix, 0,6 µl Transkriptionspuffer, 0,6 µl T7-RNA-Polymerase und 1,6-2,6 µl RNase-freies H₂O. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden den Ansätzen jeweils 2 µl Hybridisierungspuffer zugesetzt. Nach einer Denaturierung der RNA für 5 min bei 105°C erfolgte eine Abkühlung für 3 min bei RT, um eine Ausbildung der RNA-Homo- bzw. Heteroduplices zu ermöglichen. Zur Überprüfung der RNA-Menge wurde eine Hälfte der Ansätze (je 4 µl) zusammen mit der entsprechenden Menge des eingesetzten DNA-Fragments (0,5 µl) auf einem 1,2%-igen Agarose-Gel unter RNase-freien Bedingungen analysiert. Die restlichen 4 µl wurden mit 0,12 µl RNase 1, 0,6 µl RNase T1 und 11,28 µl „RNase Digestion“-Puffer versetzt und für 25 min bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationsphase wurden die Ansätze mit 3 µl

RNase-freiem Auftragspuffer vermischt und mit einem 2%-igen Agarose-Gel im Hinblick auf neu aufgetretene Banden in den gemischten Ansätzen analysiert.

2.2.11.2 Identifikation der Position der identifizierten Mutationen/SNPs

Da die genaue Position der detektierten Mutation im Gel nicht feststellbar ist, müssen die DNA-Fragmente, in denen ein Basenaustausch nachgewiesen werden konnte, kloniert und dann konventionell sequenziert werden (siehe 2.2.3). Im Falle heterozygoter Mutationen müssen mutationspositive Klone mittels NIRCA identifiziert und anschließend sequenziert werden (2.2.16).

Zur korrekten und eindeutigen Bestimmung von Positionen innerhalb der Gene und ihrer Promotoren wurde in der vorliegenden Arbeit das erste Nukleotid des Startcodons jedes Gens als Position +1 definiert (ATG = +1), das direkt davor lokalisierte Nukleotid als -1. In der Literatur wird zwar in der Regel der Transkriptionsstart als Position +1 definiert, jedoch kam es hier in der Vergangenheit durch Unsicherheiten bei der Sequenzierung von cDNA oft zu widersprüchlichen Positionsangaben. Durch die Festlegung des in jedem Falle eindeutig definierten Startcodons (bei mehreren möglichen Startcodons wird das am weitesten „upstream“ gelegene Startcodon gewählt) werden diese Schwierigkeiten umgangen. Dieses Vorgehen wurde deshalb bereits bei der Einrichtung interner Datenbanken im Rahmen des Jenaer Centrums für Bioinformatik eingesetzt (<http://www.imb-jena.de/jcb>).

2.2.12 Das Pyrosequencing

Das Pyrosequencing ist eine Methode zur Sequenzierung bekannter SNPs/Mutationen in einer hohen Probenanzahl und wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Michael Utting (Abteilung Genomanalyse am Institut für Molekulare Biotechnologie, heute Fritz-Lipmann-Institut für Altersforschung) durchgeführt. Es basiert auf der indirekten „real-time“ Detektion von Pyrophosphat, das beim Elongationsschritt einer Polymerasekettenreaktion aus reagierendem dNTP freigesetzt wird, durch die Messung der emittierten Biolumineszenz (234).

Zuerst werden die einzelnen dNTPs nacheinander dem PCR-Ansatz zugesetzt. Wird dabei dem Ansatz eine dNTP-Spezies zugesetzt, die zu dem gerade anstehenden Elongationsschritt benötigt wird (d. h., die zur spezifischen Base des DNA-Templates komplementär ist), wird dieses dNTP beim Elongationsschritt unter Freisetzung von Pyrophosphat (PPi) in den neuen, synthetisierten DNA-Strang inkorporiert, während nicht-komplementäre dNTPs zu keiner Reaktion führen. Das gebildete Pyrophosphat wird dann von ATP-Sulfurylase als Substrat zur Synthese von ATP aus ebenfalls im Reaktionsansatz vorliegendem AMP eingesetzt. Das entstehende ATP wird wiederum von einer Firefly-Luziferase bei der Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin unter Bildung von messbarer Biolumineszenz verbraucht. Diese ist dabei proportional zum gebildeten ATP und damit zur

Menge des vorher reagierenden dNTPs, so daß auch mehrere, hintereinander angeordnete gleiche Basen (die angesichts des Überschusses an dNTP auch sofort an den neu synthetisierten Strang eingebaut werden können) durch die Höhe des Lumineszenz-Peaks identifiziert werden können. Nicht verbrauchtes dATP wird schließlich durch eine Apyrase zu dAMP abgebaut; die Apyrase beeinträchtigt dabei die vorher ablaufenden Reaktionen nicht, da sie relativ reaktionsträge ist und erst zeitversetzt den Abbau überschüssigen ATPs einleitet.

Damit das dATP, das als dNTP der Reaktion zugesetzt wird, nicht ebenfalls von der Firefly-Luciferase umgesetzt wird und auf diese Weise ein falsch-positives Lumineszenz-Signal erzeugt, wird für diesen Reaktionsschritt sulfuryliertes dATP (dATP α S) eingesetzt. Dieses wird zwar von der Polymerase als Substrat akzeptiert, nicht jedoch von der Luciferase (235). Da also jeweils nur dann ein Lumineszenz-Peak gemessen werden kann, wenn ein komplementäres dNTP der Reaktion zugesetzt wird, kann durch eine computergestützte Auswertung die Sequenz des mittels PCR amplifizierten Templates abgeleitet werden. Da die Höhe des Peaks von der Menge des verbrauchten dNTPs abhängig ist, können auch heterozygote SNPs oder Mosaiksituationen nachgewiesen werden. Bei einem heterozygoten SNP wären die Peaks beiden an der SNP-Position vorliegenden Basen (wt bzw. SNP in jeweils 50% der Template-Fragmente) nur halb so hoch wie die restlichen Peaks für alle anderen Positionen (wt in allen Template-Fragmenten).

2.2.12.1 Pyrosequencing von DNA-Proben aus SM-Gewebe

Die Pyrosequencing-Reaktionen wurden mit einem PSQ96MA-Automaten in Streptavidin-bedeckten 96-Loch-Platten durchgeführt. Die als Sequenzierungs-Template dienenden, an einem DNA-Strang biotinylierten PCR-Fragmente (bis zu 5 pmol DNA) wurden auf der Platte immobilisiert und für 3 min mit 0,5 M NaOH in 70%-igem Ethanol behandelt, um die Stränge voneinander zu trennen. Nach der Entfernung der nicht biotinylierten Stränge wurden die für das Pyrosequencing benötigten Reagenzien aus dem Kit „Pyro Gold Reagents“ mittels Dispenser-Funktion im PSQ96MA-Automaten zugesetzt [4 μ l Sequenzierprimer (20 pM/ μ l), 5,5 μ l Enzym-Mix und 5,5 μ l Substrat-Mix, der Rest des Ansatzes wurde mit Wasser aufgefüllt]. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils 50 μ l. Vor jedem Elongationsschritt wurden 0,2 μ l der einzelnen dNTPs (10 μ M) unter Ausnutzung der Dispenser-Funktion zugesetzt. Die emittierte Biolumineszenz wurde bei 560 nm gemessen, von der Pyrosequencing-Software für jede Probe einzeln registriert und graphisch aufbereitet. Die eingesetzten Sequenzierprimer können der Tabelle A7 (Anhang, Seite xxxvi) entnommen werden.

Um die Methode zu validieren, wurden aus der codierenden Region und im Promotorbereich der Gene *cjun* und *cfos* verschiedene, aus der Literatur bekannte SNPs (*cjun*: -1676, -1710; *cfos*: -135, -60) - und einige neu identifizierte Mutationen (*cjun*: +706, Deletion +604 bis +606) - ausgewählt, die in hohen Allelfrequenzen auftreten (zwischen 20 und 50%

aller Allele). Dazu wurde zunächst ein kommerziell erhältliches Gemisch aus humaner DNA (isoliert aus Blut) von 80 bis 100 Individuen (Roche Diagnostics) als Template eingesetzt. Danach erfolgte der Einsatz der Methode zur Detektion dieser Mutationen/SNPs in 27 RA-, 30 OA- und 9 GT/NK-SM-Proben. Dabei wurden einige der Proben, die bereits mit dem NIRCA untersucht worden waren, als Positiv-, bzw. Negativkontrollen mitgeführt. Die untersuchten Mutationen/SNPs können der Tabelle 7 (Seite 76) entnommen werden.

2.2.13 Der DNA-Microarray zur Analyse von Mutationen/SNPs mit einer potentiellen Assoziation zu rheumatischen Erkrankungen

Um zu ermitteln, ob die mittels NIRCA (siehe 2.2.11) identifizierten sowie die in der Literatur bekannten Mutationen/SNPs in den jun- und fos-Promotoren in einer höheren Frequenz in Patienten als in Normalspendern nachweisbar sind, wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Clondia Chip Technologies ein DNA-Microarray zur Analyse dieser Mutationen/SNPs entwickelt (siehe 2.9). Durch die Untersuchung einer größeren Patientenpopulation kann damit leichter analysiert werden, ob die einzelnen Mutationen/SNPs mit dem Auftreten rheumatischer Erkrankungen assoziiert sind.

Dieser DNA-Microarray basiert dabei auf dem von der Firma Clondia entwickelten ArrayTube System. Dieses System besteht aus einem modifizierten, konventionellen Reaktionsgefäß (ähnlich dem „Eppendorf-Tube“), dem sogenannten ArrayTube (AT), in dessen Boden der eigentliche DNA-Microarray eingelassen ist. Dieser besteht aus einem transparenten Glas-Chip, der eine 2 x 2 mm große Filtermembran mit bis zu 244 synthetisierten, immobilisierten DNA-Sonden trägt. Die DNA-Sonden sind ca. 20 Nukleotide lang und enthalten in ihrer Sequenz jeweils eine Position, an der eine Mutation/ein SNP liegt; an dieser Position ist in einer Sonde das wt-Nukleotid, in einer anderen Sonde die mutierte Variante enthalten. Alle Sonden auf dem Chip liegen dabei in Duplikaten vor, um die Möglichkeit von falsch positiven oder falsch negativen Resultaten zu minimieren.

Da eine auf den Chip gegebene mutierte DNA-Probe mit höherer Effizienz die Sonde mit der mutierten Sequenz bindet (wobei allerdings eine leichte Kreuzreaktion mit der wt-Sonde stattfindet), kann somit zwischen den beiden Varianten unterschieden werden. Sollte ein(e) heterozygote(r) Mutation/SNP bzw. eine Mosaiksituation von Allelen zu einem Gemisch aus wt- und mutierten DNA-Fragmenten in der Probe führen, werden auf dem Chip beide Sonden gleichermaßen gebunden.

Um die verschiedenen codierenden Regionen und Promotor-Sequenzen bezüglich des Auftretens von Mutationen/SNPs zu untersuchen, wurden von diesen Sequenzen mittels PCR (siehe 2.2.5.1) biotinylierte DNA-Fragmente synthetisiert. Diese DNA-Fragmente wurden dann als Proben für die Untersuchungen eingesetzt. Dazu wurden sie in Hybridisierungspuffer gelöst, hitzedenaturiert und schließlich in ein (mit Hybridisierungspuffer prä-inkubiertes) AT

überführt. Die Hybridisierung erfolgte unter Schütteln über Nacht bei einer vom jeweiligen Fragment abhängenden Hybridisierungstemperatur. Am nächsten Tag wurde der Chip gründlich gewaschen und anschließend mit FCS-haltiger Lösung blockiert. Die Detektion der gebundenen biotinylierten Fragmente erfolgte mithilfe eines Streptavidin-HRP-Konjugats. Nach erneutem Waschen wurde das AT mit Peroxidase-Substrat versetzt und der sich an den Sonden niederschlagende blaue Farbstoff mit einem ArrayTube Reader (Modell ATR 01) detektiert. Die Quantifizierung erfolgte mit der Software „Iconoclust“. Das Prinzip des AT-Systems in Abbildung 5 dargestellt.

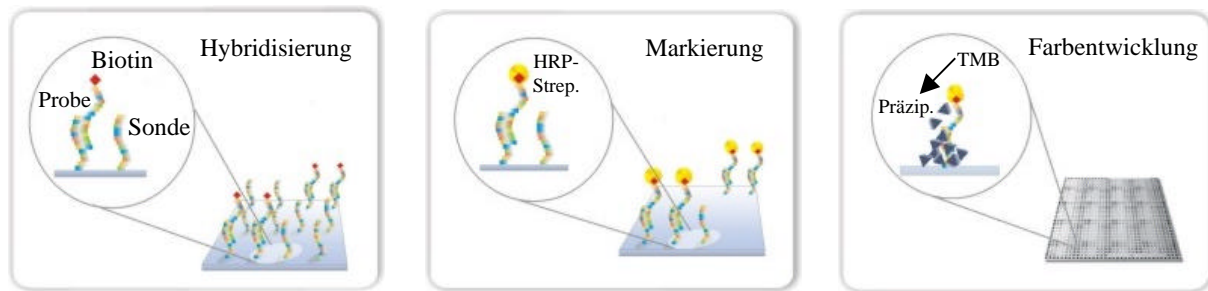


Abbildung 5: Das Prinzip des AT-Systems

(HRP-Strep: HRP-Streptavidin-Konjugat, TMB: True-Blue HRP-Substrat;
mit freundlicher Genehmigung von Clondia Chip Technologies).

2.2.13.1 Optimierung und Validierung des DNA-Microarrays

Da die Hybridisierungsbedingungen vor allem von der Sequenz der zu untersuchenden Probe (also des PCR-Fragmentes) abhängen und die Bedingungen für die verschiedenen Proben dementsprechend stark variieren, musste der jeweilige Versuchsablauf für jedes Fragment einzeln optimiert werden. Als Proben wurden DNA-Fragmente der codierenden Regionen und der Promotoren der jun-/fos-Gene eingesetzt, die mittels PCR aus Plasmiden amplifiziert wurden. Die zu variierenden Versuchs-Parameter waren dabei: die Konzentration der eingesetzten Probe, der Hybridisierungspuffer, die Hybridisierungsdauer, die Hybridisierungstemperatur, die Stärke des Schüttelns, die Zusammensetzung der Waschpuffer, die Inkubationszeit, Zusammensetzung und Konzentration der Blockierungslösung und die Inkubationszeit, Zusammensetzung und Konzentration der Markierungslösung. Zur Optimierung wurde der AT-Microarray RHEUMA_1 eingesetzt, dessen Layout und Probendefinition den Tabellen A8 und A10 (Anhang, Seite xxxvii und xxxviii) entnommen werden können. Durch die Optimierung konnten schließlich für alle Proben angemessene Versuchsbedingungen identifiziert werden. Auf dieser Basis wurde dann der Microarray RHEUMA_3 entwickelt (siehe 2.2.13.2). Neben den Mutationen/SNPs der jun- und fos-Gene enthält dieser Microarray auch einige für die RA relevante SNPs der Gene p53, TNF- α und TNFR2. Layout und Probendefinition des Microarrays RHEUMA_3 können den Tabellen A9 und A11 (Anhang, Seiten xxxvii und xl) entnommen werden.

Um eine korrekte Diskriminierung zwischen wt- und mutierten Proben zu gewährleisten, wurden initiale Experimente mit Proben der codierenden Region von *cjun* und *cfos* durchgeführt. Bei der Synthese der Test-Proben mittels PCR (siehe 2.2.5.1) wurden dabei Plasmide als Template eingesetzt, die die entsprechende Sequenz in der wt- oder mutierten Form enthielten. Die synthetisierten Probenspezies wurden dann zunächst einzeln für die Hybridisierung eingesetzt, um nachzuweisen, daß in der auf diese Weise simulierten homozygoten Situation die korrespondierende Sonde stärker markiert wurde. In einem weiteren Validierungsschritt wurden dann Gemische aus wt- und mutierten Sonden eingesetzt. Dabei wurde die heterozygote Situation durch ein 50%/50%-Gemisch ebenso simuliert wie verschiedene Mosaiksituationen, bei denen die beiden Probenspezies in ungleichen Verhältnissen eingesetzt wurden (50%/50%, 25%/75%; 90%/10%; 95%/5%). Die einzelnen Versuchsschritte und die im Laufe der Optimierung durchgeführten Parametervariationen sind in den Tabellen A12 und A13 (auf den Seiten xliii und xliv) aufgeführt.

2.2.13.2 Anwendung des DNA-Microarrays

Ausgehend von aus Blut isolierter DNA von 50 RA-, OA- und normalen Spendern wurde der DNA-Microarray für die Analyse der codierenden Regionen und der Promotoren der Gene *cjun*, *junB*, *junD* und *cfos* eingesetzt, um seine Anwendbarkeit für hohe Probenzahlen nachzuweisen. Die biotinylierten DNA-Fragmente (Proben) wurden mittels konventioneller, asymmetrischer PCR synthetisiert (siehe 2.2.5.1). Die jeweiligen PCR- und Versuchsbedingungen können der Tabelle A3 (Anhang, Seite xxx) bzw. Tabelle 5 (Seite) entnommen werden.

2.2.14 Funktionelle Analyse von Promotor-Mutationen/SNPs

Um zu analysieren, welche funktionellen Auswirkungen die in der untersuchten Patientenpopulation identifizierten Mutationen/SNPs (siehe 2.2.11) haben, wurde ein Reporter-gen-Assay auf der Basis des „dual luciferase assay systems“ eingesetzt (236). Dabei wurden die entsprechenden Promotorabschnitte in der wt- bzw. mutierten Variante in den Reporter-gen-Expressionsvektor pUBT-luc kloniert (221; siehe 2.2.3). Dieser Vektor enthält als Reporter-gen das Gen für die Firefly-Luciferase, welches in Abhängigkeit von einem vor dem Gen lokalisierten Promotor exprimiert werden kann. Dieser Promotor wurde für die funktionelle Analyse der verschiedenen Promotorabschnitte mit den geeigneten Restriktionsenzymen entfernt und durch die zu analysierenden Promotorsequenzen ersetzt (siehe 2.2.3.1). Danach wurden die endotoxinfrei isolierten (siehe 2.2.3.8) Reporter-gen-Expressionsvektoren durch Transfektion in NIH-3T3-Zellen transferiert; dabei erfolgte eine

Co-Transfektion mit dem Vektor pRL-CMV (237), der das Gen für die Renilla-Luciferase enthält und als Transfektions- und Normalisierungskontrolle diene.

Nach ein- bzw. zweitägiger Kultur wurden die Zellen lysiert und die Expression des Reporterproteins gemessen. Dadurch konnte die Expression des Reporterproteins unter Einfluß des wt-Promotors mit der Reporterprotein-Expression unter Einfluß der mutierten Promotorvariante verglichen werden. Normalisiert wurden die verschiedenen Ansätze dabei mittels der Menge der exprimierten Renilla-Luciferase. Die Menge der exprimierten Luziferasen wird dabei anhand der Emission der Biolumineszenz bestimmt, die (neben der Freisetzung von CO₂) bei der Umwandlung von Coelenterazin in Coelenteramid (unter Umsatz von O₂) durch die Renilla-Luciferase (238) bzw. durch die Umwandlung von Luziferin in Oxyluziferin durch die Firefly-Luciferase entsteht (unter Umsatz von O₂ und ATP; 239). Die Transfektion der Zellen mit den verschiedenen Reporter-Expressionsvektoren erfolgte bei den stimulierten Ansätzen in Duplikaten und bei den unstimulierten Ansätzen in Triplikaten.

2.2.14.1 Transfektion von NIH-3T3-Zellen mittels Polyfect Transfection Reagent

Für die Transfektion wurden die hergestellten pUBT-luc Reporter-Gen-Vektoren mit den wt- bzw. mutierten Promotorvarianten sowie die pRL-CMV Kontrollvektoren endotoxinfrei isoliert (2.2.3.8) und auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

Die zur Transfektion benötigten NIH-3T3-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen/Loch in 2 ml D10F+ in 6-Loch-Platten ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und mit 1 ml D10F+ versetzt.

Zur Transfektion wurde 1 µl pUBT-luc (1 µg/µl) und 1 µl pRL-CMV (0,01 µg/µl) in 98 µl DMEM aufgenommen und die Lösung für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Ansätze mit jeweils 12 µl Polyfect Transfection Reagent versetzt, für 10 min bei RT inkubiert und dann mit D10F+ auf 1 ml aufgefüllt. Abschließend wurden die Ansätze komplett auf die Zellen in den 6-Loch-Platten gegeben, so daß bei der Transfektion ein Endvolumen von 2 ml erreicht wurde. Nach einer Inkubation der transfizierten Zellen für 24 bzw. 48 h bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und nach Zugabe von 100 µl Passive Lysis Buffer (Promega) mithilfe von Zellschabern lysiert. Nach 10-minütigem Schütteln der Lysate bei RT und 500 rpm wurden die Zelltrümmer durch eine Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 14000 rcf entfernt. Der Überstand wurde abgenommen, in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur Messung der Lumineszenz bei -70°C gelagert.

Um die Funktion der Promotorabschnitte in einem stimulierten Zustand zu untersuchen, wurden weitere Ansätze 16 h bzw. 40 h nach der Transfektion (also jeweils 8 h

vor der Lyse der Zellen) mit 10 ng/ml PMA stimuliert. Alle sonstigen Schritte vor und nach der Stimulierung wurden nicht verändert.

2.2.14.2 Lumineszenzmessung

Um die Lumineszenz in den einzelnen Proben zu messen, wurden 20 µl der Lysate in eine weiße 96-Loch-Platte überführt. Die Auswertung erfolgte mithilfe des „dual luciferase assay systems“. In einem Spektrophotometer wurden unter Ausnutzung der Dispenser-Funktion jeweils 50 µl Luciferase Assay Reagent II pro Ansatz zugesetzt und die entstehende Lumineszenz der exprimierten Firefly-Luciferase gemessen. Danach wurden die Ansätze mit jeweils 50 µl Stop & Glo Reagent versetzt und die Lumineszenz der Renilla-Luciferase (Transfektions- und Normalisierungskontrolle) gemessen. Die Ergebnisse der Firefly-Luciferase-Messung wurden dann durch die Ergebnisse der Renilla-Luciferase-Messung geteilt und damit normalisiert.

2.2.15 Agarose-Gelelektrophorese

Die Spezifität bzw. Quantität der Produkte der konventionellen PCR wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Bei den Versuchen zur mRNA-Expressionsanalyse wurden in der Regel 1,5%-ige Gele für die Analysen eingesetzt, bei den Experimenten zur Mutationsdetektion fanden 1,2%-ige bzw. 2%-ige Gele Verwendung.

Für die Expressionsanalysen wurden jeweils 10 µl der Produkte aus der konventionellen PCR bzw. 5 µl der Produkte aus der „real-time“ PCR analysiert, für die Mutationsanalyse-Experimente 4 µl der synthetisierten Fragmente bzw. der transkribierten RNA. Die Elektrophorese der RNA fand jeweils unter RNase-freien Bedingungen statt.

Die Gelelektrophorese wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 80 V Spannung und 30 min (kurze Fragmente und RNA) bzw. 45 min Laufzeit (lange Fragmente). Nach dem Ende der Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht photographiert oder mit einem digitalen Geldokumentationssystem gescannt und die Ergebnisse gespeichert.

2.2.16 Sequenzierung

Um die Sequenzen der amplifizierten DNA-Fragmente zu überprüfen, wurde in dieser Studie eine modifizierte Sequenzierung eingesetzt, die auf dem Prinzip der von Frederick Sanger entwickelten „Dideoxymethode“ basiert (240). Mit dieser Methode erhält man gewöhnlich Sequenzen bis zu 400 Nukleotiden.

Für die Sequenzierung der einzelnen PCR-Produkte und der verschiedenen Plasmide wurden die Primer eingesetzt, die auch zur Synthese der jeweiligen Fragmente eingesetzt wurden. Bei der Sequenzierung fand der „Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ Verwendung. Die Sequenzierungsreaktionen wurden in einem „Master Cycler

Gradient“ Thermocycler in Ansätzen mit 15 µl Volumen durchgeführt. In den Ansätzen waren enthalten: 10-40 ng DNA (entspricht einem Volumen von 1-10 µl), 10 pmol des entsprechenden Primers (entspricht einem Volumen von 1 µl) und 4 µl Big Dye-Mix. Folgende Zyklusparameter wurden für die Sequenzierungsreaktionen eingesetzt: 25 Zyklen mit Denaturierung bei 98°C für 10 s, Primer-Anlagerung bei 50°C für 5 s und lineare Amplifikation bei 60°C für 4 min. Nach dem Ende der Reaktion wurden die Ansätze mit 85 µl H₂O versetzt und die DNA durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumazetat (pH 4,8) und 250 µl 96%-igem Ethanol gefällt. Im Anschluß an eine 10-minütige Inkubation bei RT erfolgte eine Zentrifugation des Gemisches für 20 min bei 4°C mit 15700 rcf. Der Überstand wurde entfernt, das DNA-Pellet einmal mit 100 µl 70%-igem Ethanol gewaschen, dann für 5 min bei 30°C unter Vakuum in 20 µl „Template Suppression Reagent“ gelöst und schließlich für 5 min bei 95°C inkubiert. Nach einer Abkühlung des Ansatzes für 5 min bei 4°C stand er dann für die Sequenzierung mit einem Fluoreszenz-Sequenzierer zur Verfügung.

2.2.17 Statistische Analyse und *in silico*-Analysen

Die aus der mRNA- und Proteinexpressionsanalyse der einzelnen Proben gewonnenen Daten wurden als Mittelwerte (mean) \pm Standardfehler (standard error of the mean, SEM) dargestellt. Um die Unterschiede in der mRNA- und Proteinexpression der verschiedenen Patientengruppen (RA, OA, GT und NK) in der SM und den isolierten Zellpopulationen statistisch zu analysieren, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test herangezogen. Unterschiede mit einem *P*-Wert von $\leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

Da sich die mRNA-Expression in NK- und GT-Proben nicht signifikant unterschied, wurden diese beiden Kontrollgruppen für die Korrelationsanalysen zusammengefaßt. Die Korrelationsanalysen zwischen den experimentellen Daten sowie zwischen den Daten und den klinischen Parametern der einzelnen Patienten wurden mit dem Spearman-Rank-Test durchgeführt. Bei diesen multiplen Korrelationsanalysen wurde ein geringeres Niveau ($P \leq 0.01$) als Maß für die statistische Signifikanz akzeptiert, um die Gefahr von falsch positiven Korrelationen aufgrund der multiplen Vergleiche zu minimieren. Durchgeführt wurde die statistische Analyse mit dem Software-Programm SPSS 10.0.

Analysen zum Konservierungsgrad der einzelnen Basen wurden für die jun-Promotoren von Frau Dr. U. Gausmann und für den cfos-Promotor von Herrn Dr. K. Szafranski am Institut für Molekulare Biotechnologie mit dem Programm Multi-PIP-Maker („multi percentage identity plot“) durchgeführt (http://www.bx.psu.edu/miller_lab). Mit diesem Programm wurden die homologen jun- und fos-DNA-Sequenzen verschiedener Spezies miteinander verglichen. Anhand der Häufigkeit von Abweichungen zwischen den einzelnen Spezies konnte der Konservierungsgrad berechnet werden. Für den Vergleich der DNA-Sequenzen von cjun und cfos wurden folgende Spezies herangezogen: Mensch, Schimpanse, Schwein, Rind, Hund, Katze, Ratte, Maus, Opposum, Huhn und Zebrafisch. Für junB und junD wurden Mensch, Schimpanse, Hund, Ratte, Maus und Zebrafisch miteinander verglichen, wobei allerdings zum Zeitpunkt der Analyse nur für Mensch, Schimpanse, Ratte und Maus vollständige Daten über die gesamte Promotorregion vorlagen.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der mRNA-Qualität

Um die Qualität und die Stabilität der für die cDNA-Synthese eingesetzten mRNA zu überprüfen, wurden Aliquots (je 5 µl) von 3 NK-, 3 GT-, 5 OA- und 5 RA-RNA-Proben mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer analysiert. Dabei zeigten die Elektropherogramme aller untersuchten Proben distinkte Fluoreszenz-Peaks der 18S- und der 28S-rRNA, klare Grundlinien ohne Unregelmäßigkeiten und das Fehlen weiterer Banden, die auf eine Degradation der RNA oder eine Kontamination der RNA-Probe mit DNA hingewiesen hätten (exemplarisch dargestellt in Abbildung 6A). Durch das Auftreten gut definierter 18S- und 28S-rRNA-Gelbanden ohne weitere Gelbanden oder einen undefinierten “Schmier” im Gel kann die gute RNA-Qualität auch direkt anhand des Gelbildes bestätigt werden (siehe Abbildung 6B auf der folgenden Seite).

In allen untersuchten Proben betrug das Verhältnis von 28S- zu 18S-rRNA wie gewünscht 1,6; lediglich bei einer Probe wurde ein etwas geringeres Verhältnis von 1,4 akzeptiert, da auch in diesem Fall keine weiteren Anzeichen mangelnder RNA-Qualität vorlagen.

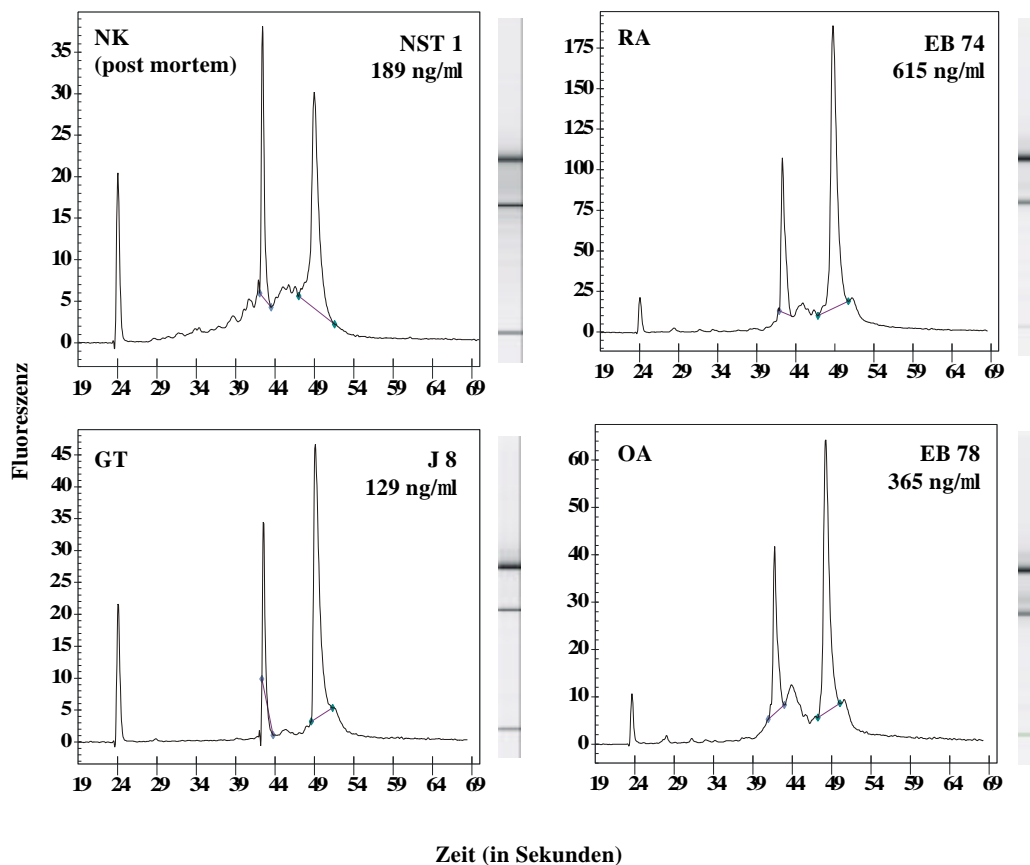


Abbildung 6A: Elektropherogramme ausgewählter Proben aus den vier Patienten-/Probandengruppen.

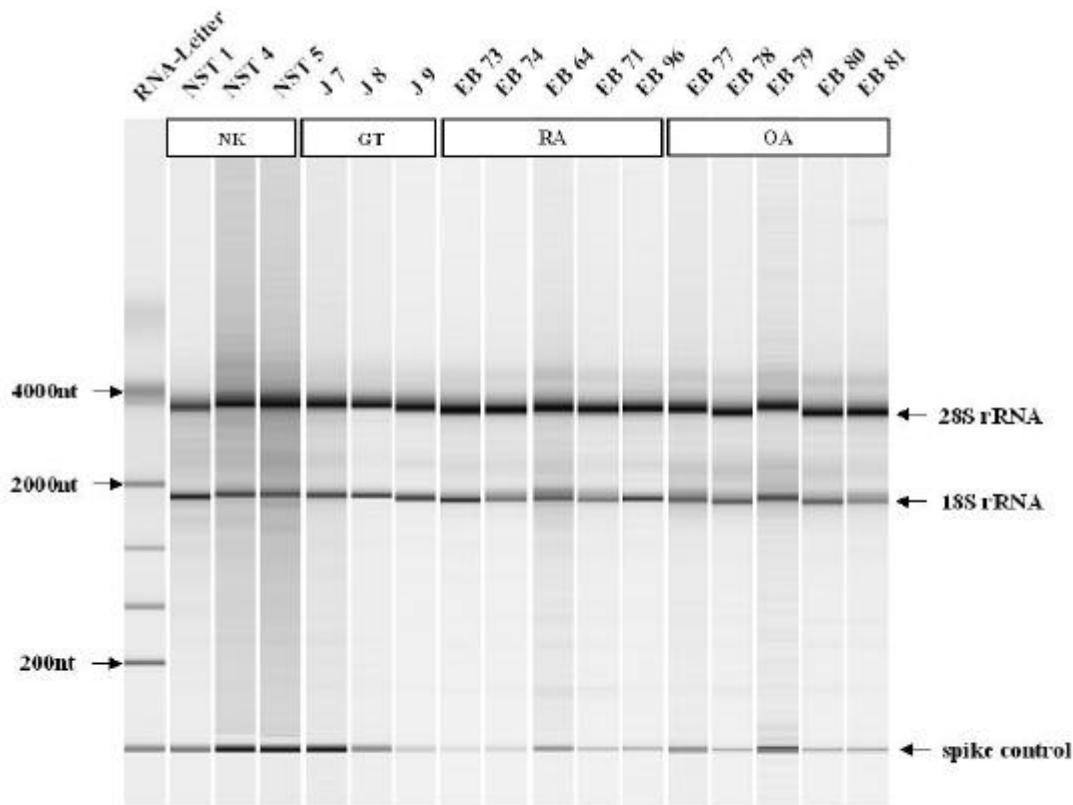


Abbildung 6B: Gelbilder aller hinsichtlich ihrer RNA-Qualität untersuchten Proben.

3.2 Quantifizierung der jun- und fos-mRNA- und Proteinexpression

3.2.1 Quantifizierung der jun- und fos-mRNA-Expression in der SM

Die Quantifizierung der jun- und fos-mRNA-Expression wurde mit der zuverlässigen und sehr sensitiven „real-time“ RT-PCR durchgeführt. Das ermittelte mittlere Expressionsniveau der cjun mRNA in post mortem NK war höher (5-fach), das Niveau in GT signifikant höher (8-fach) als die Expression in RA ($P = 0,018$) und OA ($P = 0,019$; Abbildung 7A auf der folgenden Seite), während RA und OA vergleichbare Expressionsniveaus aufwiesen. Alle SM-Proben mit Ausnahme von einer NK-, zwei OA- und zwei RA-Proben wiesen eine cjun-mRNA-Expression auf.

Das junB-mRNA-Expressionsniveau war in post mortem NK, OA und RA vergleichbar. Die junB-mRNA-Expression in GT war höher als in OA und RA (4-fach; Abbildung 7B). Alle SM-Proben mit Ausnahme von einer NK-, drei OA- und einer RA-Probe wiesen eine junB-mRNA-Expression auf.

Die junD-mRNA-Expressionsniveaus waren in post mortem NK, OA und RA sehr ähnlich. GT-Proben wiesen ein höheres Expressionsniveau auf als RA- und OA- (5-fach), bzw. NK-Proben (12-fach; Abbildung 7C). Alle SM-Proben mit Ausnahme von einer NK-, einer OA- und drei RA-Proben wiesen eine junD-mRNA-Expression auf.

Das cfos-mRNA-Expressionsniveau in RA und OA war vergleichbar, betrug aber ungefähr das 3-fache der Expression in post mortem NK. GT-Proben wiesen eine höhere mittlere Expression auf als RA- (17-fach), OA- (20-fach) und NK-Proben (60-fach; Abbildung 7D). Diese wurde hauptsächlich durch zwei Proben mit extrem hoher cfos-mRNA-Expression verursacht. Alle SM-

Proben mit Ausnahme von einer NK-, drei OA- und drei RA-Proben wiesen eine cfos-mRNA-Expression auf.

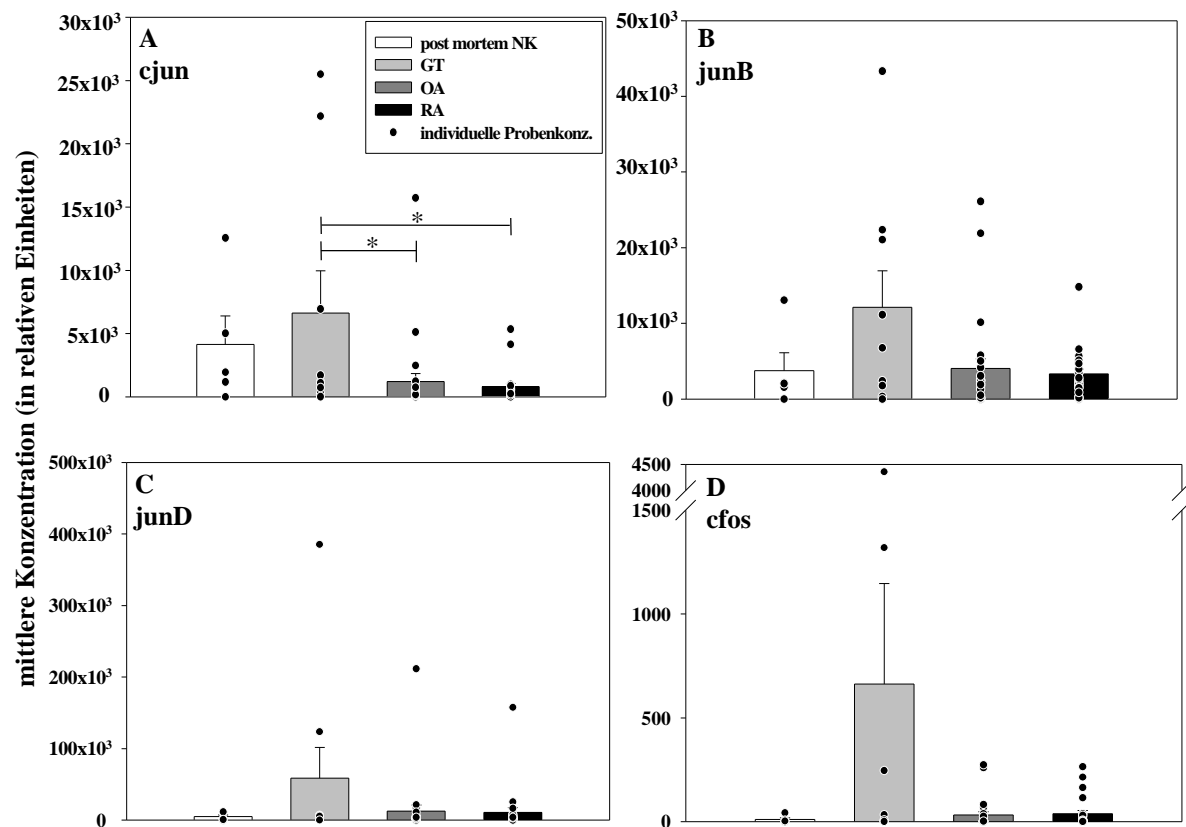


Abbildung 7: mRNA-Expression der jun- und fos-Gene in der NK- (n = 5), GT- (n = 9), OA- (n = 25) und RA-SM (n = 24). Signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

3.2.2 Quantifizierung der jun- und fos-mRNA-Expression in isolierten Zellpopulationen

In OA-SFB konnte im Vergleich zu RA-SFB eine leicht höhere Expression von cjun (2-fach; Abbildung 8A auf der folgenden Seite), junB (2.5-fach; Abbildung 8B), und junD (3-fach; Abbildung 8C) nachgewiesen werden, die Expression von cfos war hingegen in RA und OA vergleichbar (Abbildung 8D).

In isolierten synovialen M ϕ aus OA-Proben konnte im Vergleich zu RA-synovialen M ϕ ebenfalls eine leicht höhere Expression von cjun und junB (beide 2-fach; Abbildung 9A/B auf der folgenden Seite) nachgewiesen werden. Die mRNA-Expression von junD und cfos war in diesem Fall in OA und RA vergleichbar (Abbildung 9C/D). Keiner der Unterschiede in SFB oder M ϕ wies eine statistische Signifikanz auf.

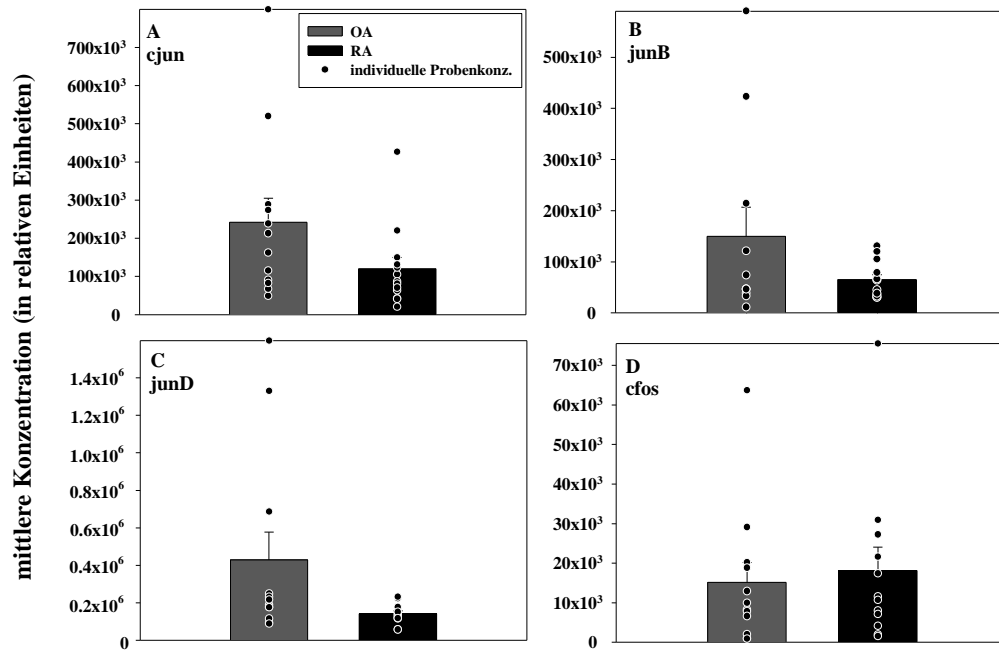


Abbildung 8: mRNA-Expression der *jun*- und *fos*-Gene in OA- (n = 12) und RA-SFB (n = 13).

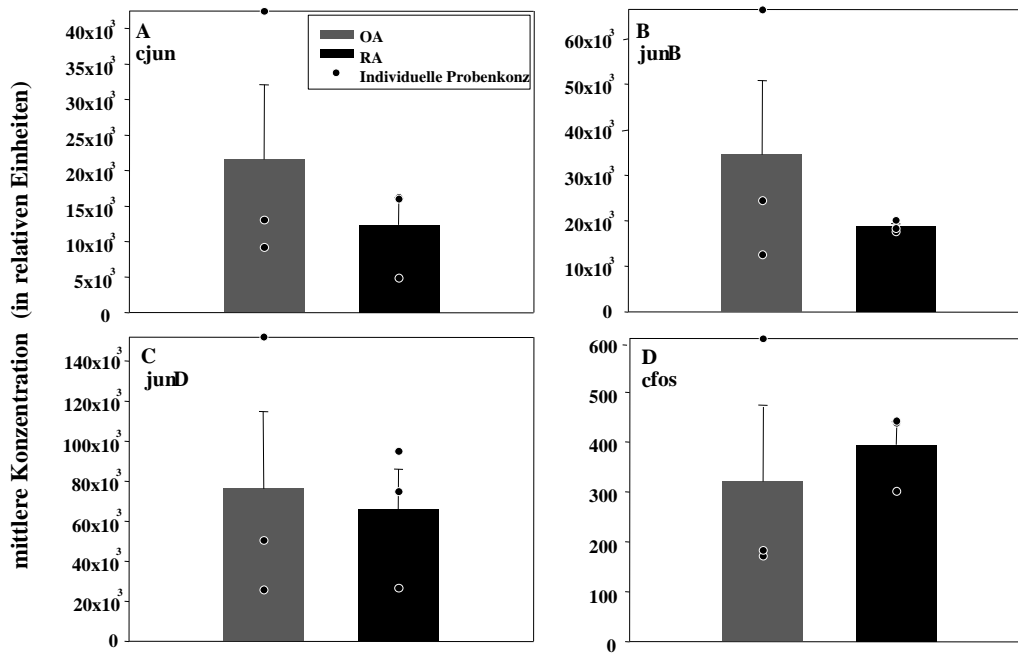


Abbildung 9: mRNA-Expression der *jun*- und *fos*-Gene in OA- (n = 3) und RA-Mφ (n = 3).

3.2.3 Quantifizierung der Jun- und Fos-Proteinexpression in der SM

Die Quantifizierung der Jun- und Fos-Proteinexpression erfolgte mit Kit-Systemen, die auf der Methode des ELISAs basieren. Das mittlere Expressionsniveau der cJun-Proteine war in post mortem NK und RA vergleichbar, die Expression in RA war allerdings höher als in OA (4,5-fach) und GT (3-fach; Abbildung 10A). Die Anzahl positiver Proben betrug 10/13 für RA, 7/13 für OA, 3/6 für GT und 5/5 für post mortem NK.

Das mittlere JunB-Proteinexpressionsniveau war in RA signifikant höher als in OA (23-fach; $P = 0,045$) und numerisch höher als in GT (5-fach) bzw. post mortem NK (9-fach; Abbildung 10B). Die Anzahl positiver Proben betrug 6/13 für RA, 2/13 für OA, 3/6 für GT und 2/5 für post mortem NK.

Das mittlere JunD-Proteinexpressionsniveau war in RA signifikant höher als in OA (7-fach; $P = 0,037$) und post mortem NK (9-fach; $P = 0,016$) und numerisch höher als in GT (4-fach; Abbildung 10C). Die Anzahl positiver Proben betrug 12/13 für RA, 10/13 für OA, 6/6 für GT und 3/5 für post mortem NK.

Das mittlere cFos-Proteinexpressionsniveau war in RA und NK vergleichbar, aber numerisch höher als in OA (4-fach) und GT (13-fach; Abbildung 10D). Die Anzahl positiver Proben betrug 5/13 für RA, 9/13 für OA, 2/6 für GT und 3/5 für post mortem NK.

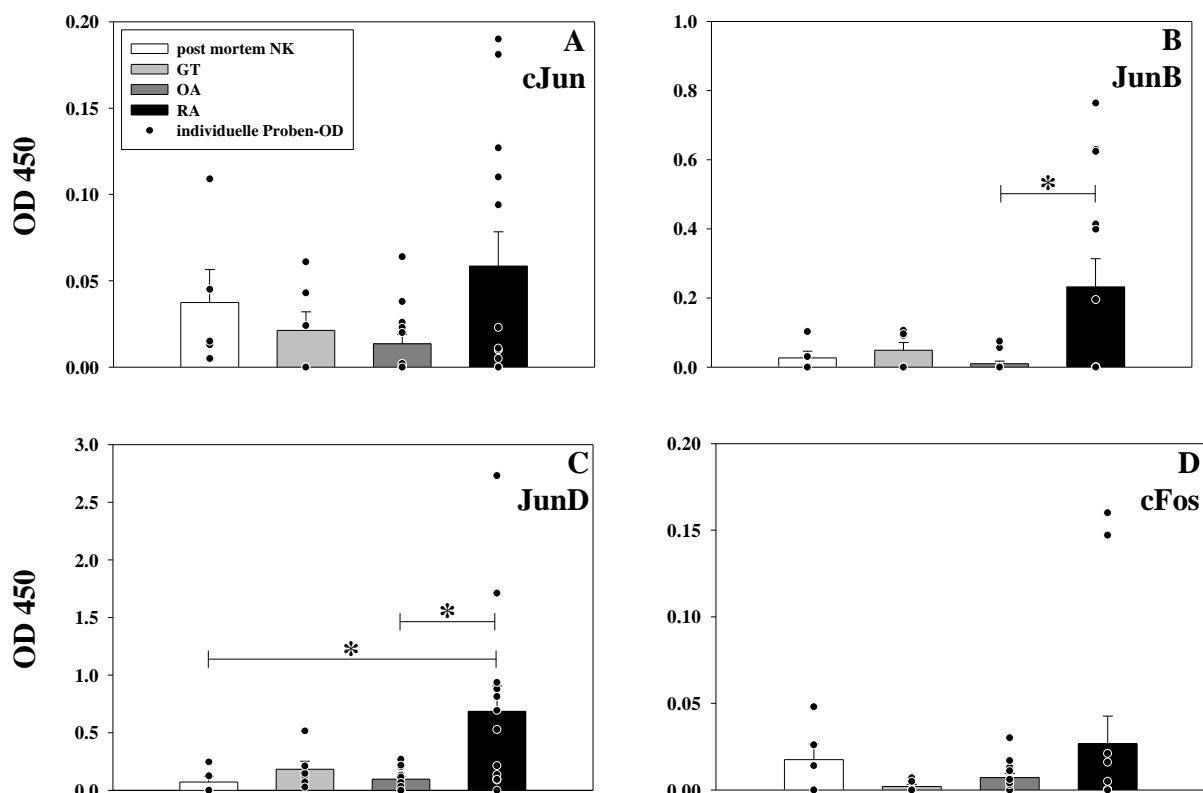


Abbildung 10: Expression der Jun- und Fos-Proteine in NK- (n = 5), GT- (n = 6), OA- (n = 13) und RA-SM (n = 13). Signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

3.2.4 Immunhistochemische Detektion der cFos- und JunB-Proteinexpression

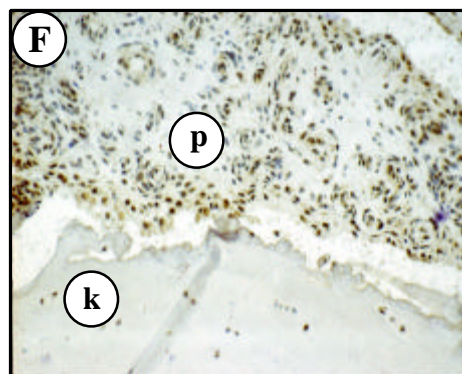
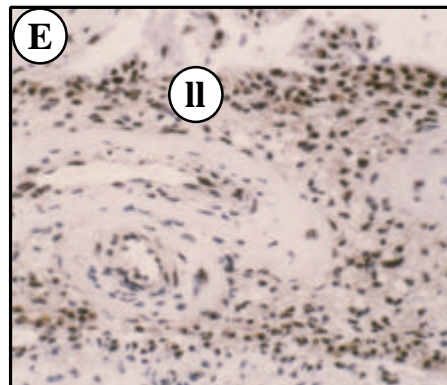
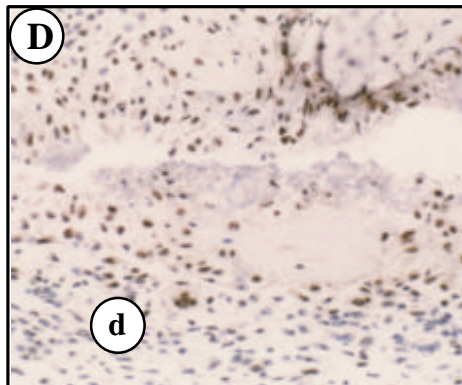
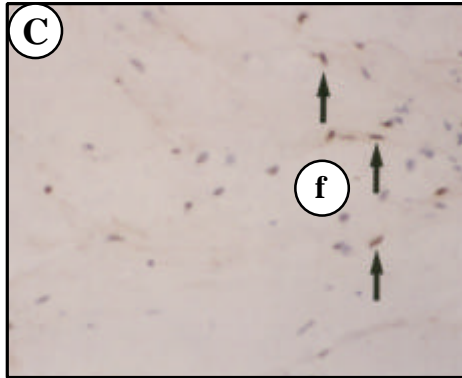
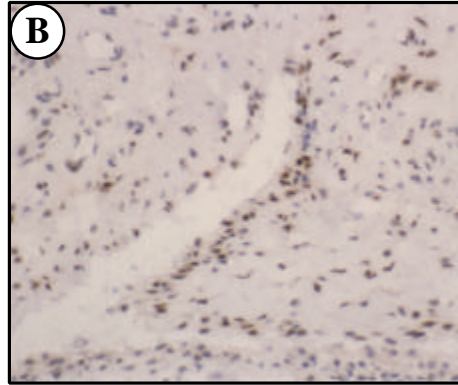
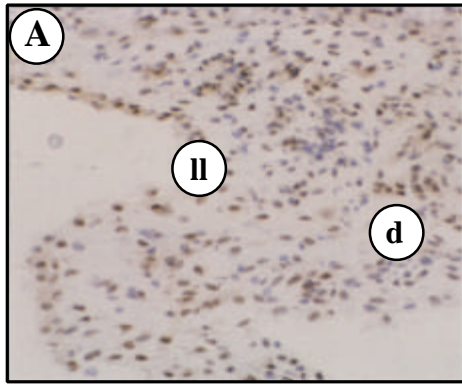
Der immunhistochemische Nachweis der cFos- und JunB-Expression erfolgte in Kryostat-Schnitten der SM mittels affinitätsgereinigter polyklonaler AK. Die Gegenfärbung des Zellkerns erfolgte mit Hämatoxylin. Die Ergebnisse dieser Analyse in 10 RA-, 6 OA- und 6 NK-/GT-Proben sind für jeweils eine Probe in Abbildung 11 auf der folgenden Seite dargestellt. Abbildung 11A - C zeigt die Analyse der cFos-Proteinexpression in RA-, OA- und GT-SM-Proben. In Abbildung 11D - F ist die JunB-Proteinexpression in RA- und OA-SM sowie an der Knorpel-Pannus-Grenze in der RA-SM dargestellt.

In der RA-SM konnte eine deutliche JunB- und cFos-Proteinexpression vor allem in der Deckzellschicht und in diffusen Infiltraten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11A bzw. 11D). Eine starke Expression von JunB war auch an der Knorpel-Pannus-Grenze in der RA-SM nachweisbar (Abbildung 11F). In der OA-SM war ebenfalls eine deutliche JunB- und cFos-Expression in der Deckzellschicht detektierbar (Abbildung 11B bzw. 11E). Allerdings war die Zahl der positiven Zellen bei der Betrachtung aller SM-Proben insgesamt geringer als in der RA-SM.

Die Detektion der cFos-Proteinexpression in GT-SM-Proben zeigte, daß in dieser Patientenpopulation ebenfalls eine geringere Proteinexpression als in der RA vorliegt. Die cFos-Expression konnte dabei vor allem in fibrösen Gebieten nachgewiesen werden (Abbildung 11C).

Insgesamt exprimieren vor allem Zellen in der Deckzellschicht und in diffusen Infiltraten große Mengen an Proto-Onkoproteinen. Dabei treten in der RA-SM mehr positive Zellen als in der OA-SM auf. Durch *in situ* Hybridisierung von Kollagen III-mRNA (durch die SFB identifiziert wurden) konnte nachgewiesen werden, daß die Produktion von JunB/cFos hauptsächlich in den SFB stattfindet (Daten nicht gezeigt). Auch am Ort pro-destruktiver Prozesse, d. h. an der Knorpel-Pannus-Grenze, konnte eine Proto-Onkoprotein-Expression nachgewiesen werden.

Abbildung 11 (folgende Seite): Immunhistochemische Detektion von cFos (A-C) und JunB (D-F) in der RA- (A, D), OA- (B, E)- und GT-SM (C) bzw. an der Knorpel-Pannus-Grenze in der RA-SM (F); ll: „lining layer“ – Deckzellschicht; d: diffuse Infiltrate; p: Pannus, k: Knorpel, f: fibröse Gebiete; Pfeile zeigen Proto-Onkoprotein-positive Zellkerne an.
Die Originalvergrößerungen betragen für A, B und C 184 x; für D, E und F 168 x.



3.2.5 Korrelationsanalysen

In der SM von NK-/GT-Proben bzw. OA-Proben traten signifikante Korrelationen zwischen der mRNA-Expression von cjun und cfos, cjun und junD sowie cfos und junD auf (Tabelle 2). Die mRNA-Expression in RA-Proben wies hingegen signifikante Korrelationen zwischen cjun und junB, cjun und junD sowie cfos und junD auf (Tabelle 2), was in einem verschobenen Korrelationsprofil zwischen NK/GT und OA auf der einen und RA auf der anderen Seite resultierte (Abbildung B1 im Anhang, Seite xlv).

In der SM von NK-/GT-Proben trat außerdem eine signifikante Korrelation zwischen der Proteinexpression von cJun und JunB sowie JunD und JunB auf (Tabelle 2; Abbildung B1), während in RA-SM eine signifikante Korrelation zwischen cJun und cFos sowie JunD und JunB nachgewiesen werden konnte. Eine Verschiebung des Korrelationsprofils tritt also auch bei der Proteinexpression in RA-SM verglichen mit NK-/GT-SM auf (Tabelle 2; Abbildung B1). Auffällig ist dabei besonders die Umkehrung der Korrelationen zwischen den Paaren cjun – cfos und cjun – junB in NK/GT und RA sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene.

RA-SM-Proben wiesen signifikante Korrelationen zwischen der JunB- bzw. der JunD-Proteinexpression und dem Alter der entsprechenden Patienten auf (beide: $r = 1.0$, $P < 0.001$). Außerdem konnten in RA-Proben signifikante negative Korrelationen zwischen JunB/JunD und dem C-reaktiven Protein (CRP; $r = -1.0$, $P < 0.001$) sowie zwischen JunB/JunD und dem Rheumafaktor (RF; $r = -1.0$, $P < 0.001$) ermittelt werden.

Für insgesamt 33 Patienten lagen darüber hinaus sowohl mRNA- als auch Proteinexpressionsdaten vor, allerdings ergaben die durchgeführten Analysen in keiner Patientengruppe signifikante Korrelationen zwischen der Expression der verschiedenen mRNA-Spezies und dem entsprechenden Proto-Onkoprotein.

Tabelle 2: Spearman-Rank Korrelationsanalyse der mRNA- und der Proteinexpression der jun- und fos-proto-Onkogene in der Synovialmembran von NK/GT (mRNA: n = 14; Protein: n = 11) und RA-Patienten (mRNA: n = 24; Protein: n = 13)

	NK/GT		RA
mRNA	$r = 0.754$ $P < 0.01$ n = 14	cjun – cfos	n. s.
	n. s.	cjun – junB	$r = 0.600$ $P < 0.01$ n = 24
	$r = 0.912$ $P < 0.01$ n = 14	cjun – junD	$r = 0.543$ $P < 0.01$ n = 24
	$r = 0.807$ $P < 0.01$ n = 14	junD – cfos	$r = 0.764$ $P < 0.01$ n = 24
	n. s.	cJun – cFos	$r = 0.626$ $P = 0.02$ n = 13
	$r = 0.710$ $P = 0.01$ n = 11	cJun – JunB	n. s.
Protein	$r = 0.605$ $P < 0.05$ n = 11	JunD – JunB	$r = 0.741$ $P < 0.01$ n = 13

r = Korrelationskoeffizient, P = P -Wert (Signifikanz), n. s. = nicht signifikant

OA-mRNA Proben (n = 25) zeigten das gleiche Korrelationsmuster wie NK-/GT-Proben (cjun – junD: $r = 0.732$, $P < 0.001$; cjun – junB: nicht signifikant; cjun – cfos: $r = 0.705$, $P < 0.001$; junD – cfos: $r = 0.574$, $P = 0.003$); OA-Proteinproben wiesen keine Korrelationen auf.

3.3 Quantifizierung der mRNA- und Proteinexpression von stabilitätsmodifizierenden Proteinen

3.3.1 Quantifizierung der AUF-1-, TTP- und HuR-mRNA-Expression in der SM

Die Quantifizierung der mRNA-Expression der mRNA-stabilitätsmodifizierenden Proteine wurde ebenfalls mittels „real-time“ RT-PCR durchgeführt.

Das mittlere Expressionsniveau der AUF-1-mRNA in post mortem NK, GT, OA und RA war vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Alle SM-Proben mit Ausnahme von einer OA-Probe wiesen AUF-1-mRNA-Expression auf.

Das TTP-mRNA-Expressionsniveau war in GT im Vergleich zu post mortem NK nur leicht numerisch erhöht (1,3-fach). Die GT-Proben wiesen eine höhere TTP-mRNA-Expression im Vergleich zur RA (2,5-fach) und eine signifikant höhere TTP-mRNA-Expression im Vergleich zur OA auf (6,5-fach; $P = 0,015$). Außerdem zeigten die NK-Proben eine signifikant höhere Expression als die OA- (5-fach; $P = 0,007$) und RA-Proben (2-fach; $P = 0,045$). Die Expression in der RA war andererseits signifikant höher als in OA-Proben (2,5-fach; $P = 0,013$; Abbildung 12A). Alle SM-Proben mit Ausnahme von einer RA-Probe wiesen eine TTP-mRNA-Expression auf.

Die HuR-mRNA-Expressionsniveaus waren in post mortem NK, OA und RA sehr ähnlich, allerdings wiesen die NK-Proben ein signifikant höheres Expressionsniveau auf als GT-Proben (4-fach; $P = 0,034$; Abbildung 12B). Alle SM-Proben wiesen HuR-mRNA-Expression auf.

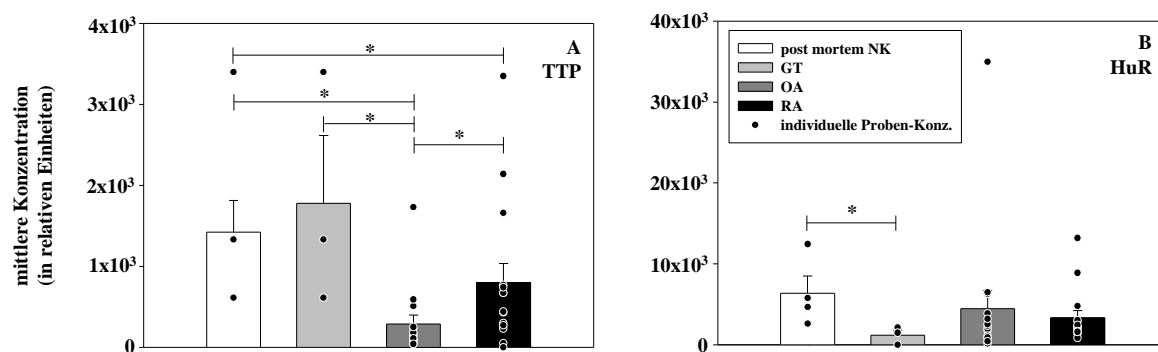


Abbildung 12: mRNA-Expression der Gene TTP und HuR in der NK- (n = 4), GT- (n = 3), OA- (n = 15) und RA-SM (n = 15). Signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

3.3.2 Quantifizierung von AUF-1-, TTP- und HuR-Proteinexpression in der SM

Die Proteinexpression der mRNA-stabilitätsmodifizierenden Proteine wurde mittels Western-Blot quantifiziert.

Das mittlere AUF-1-Proteinexpressionsniveau war in post mortem NK-, GT-, OA- und RA-Proben vergleichbar, alle Proben waren positiv (Daten nicht gezeigt).

Das mittlere TTP-Proteinexpressionsniveau war in OA und RA vergleichbar. RA-Proben wiesen ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau auf als GT- (1,4-fach; $P = 0,039$) und NK-Proben (1,6-fach; $P = 0,046$; Abbildung 13A). Alle Proben waren positiv.

In post mortem NK- und GT-Proben war keine HuR-Proteinexpression nachweisbar. RA-Proben zeigten eine erhöhte HuR-Proteinexpression im Vergleich zu NK-Proben und eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zu GT-Proben ($P = 0,043$), aber nur eine leicht erhöhte Expression im Vergleich zu OA-Proben (1,5-fach; Abbildung 13B). Die Anzahl positiver Proben betrug 5/6 für RA-SM, 4/6 für OA-SM, 0/3 für GT und 0/2 für post mortem NK.

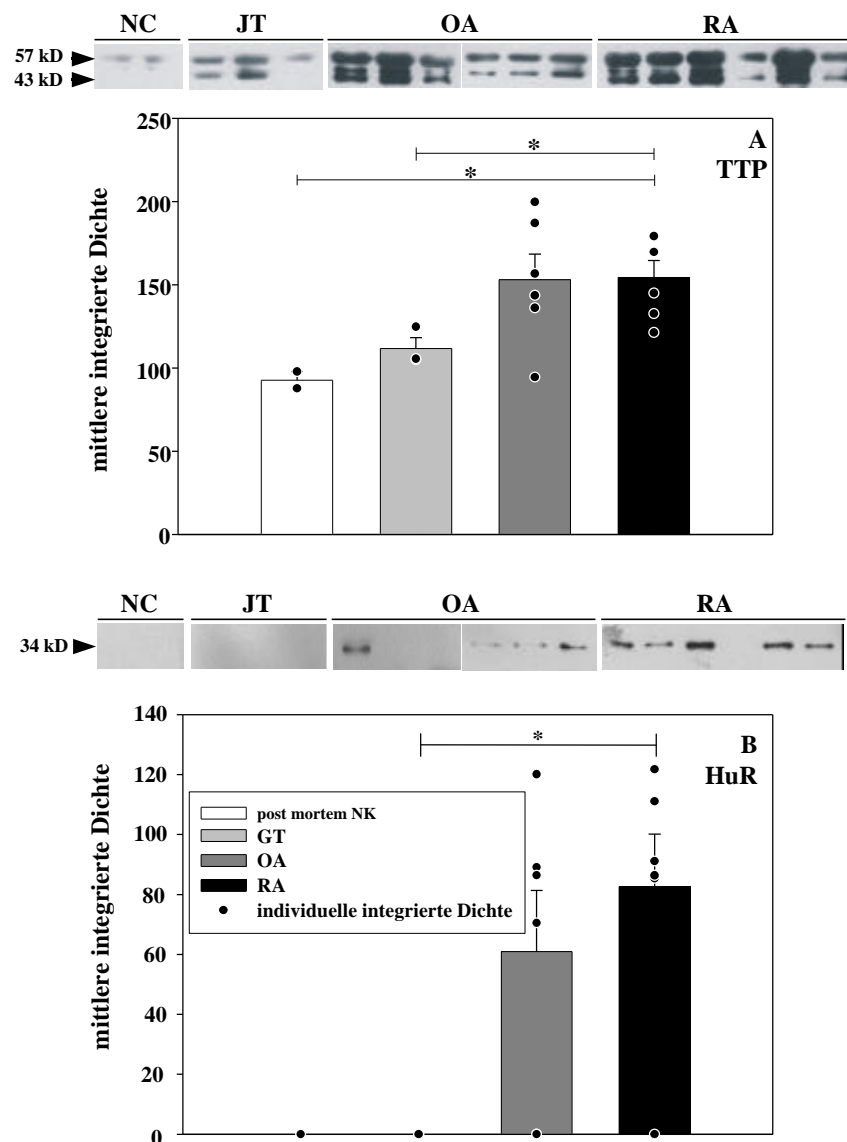


Abbildung 13: TTP- und HuR-Proteinexpression in der NK- (n = 2), GT- (n = 3), OA- (n = 6) und RA-SM (n = 6). Signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

3.4 NIRCA-basierte Mutationsanalyse der codierenden Regionen von junB und junD in der SM

3.4.1 NIRCA-basierte Mutationsanalyse der codierenden Region des Gens junB

Um Mutationen in der codierenden Region (und den Promotoren, siehe 3.5) auch dann zu detektieren, wenn diese in heterozygoter Form oder nur in einem geringen Teil der Zellen auftreten („Mosaiksituation“), wurde der hochsensitive NIRCA zur Mutationsanalyse eingesetzt. Die Mutationsanalyse der codierenden Region des Gens junB in jeweils 15 RA- und OA-Proben sowie 6 NK führte zur Identifikation eines bereits bekannten SNPs in einer RA- (EB 6), zwei OA- (EB 8 und 9) und einer NK-Probe (NST 1). Dieser SNP konnte nach Klonierung und Sequenzierung an der Position +474 lokalisiert werden.

Es handelt sich dabei um einen Basenaustausch an der dritten Position eines die AS Serin kodierenden Basentriplets (TCC → TCA), also um eine stille Mutation, die keinen AS-Austausch nach sich zieht. Da aufgrund des stillen Charakters keine funktionellen Auswirkungen dieser Mutation zu erwarten waren, wurde die entsprechende mutierte Sequenz nicht bezüglich funktioneller Auswirkungen auf das Zellverhalten überprüft.

3.4.2 NIRCA-basierte Mutationsanalyse der codierenden Region des Gens junD

Die in (241) beschriebene Mutationsanalyse der codierenden Region des Gens junD in jeweils 7 RA und OA Proben sowie 3 NK wurde im Rahmen dieser Dissertation auf jeweils 10 RA- und OA-Proben sowie 6 NK erweitert. Allerdings konnten auch bei den neuen Analysen keine Mutationen nachgewiesen werden, alle Proben verfügten in der codierenden Region über die wt-Sequenz.

3.5 NIRCA-basierte Mutationsanalyse der Promotorregionen der jun- und fos-Gene

3.5.1 NIRCA-basierte Mutationsanalyse der Promotorregion der Gene cjun, junB, junD und cfos in der RA-SM

Die Mutationsanalyse von jeweils ca. 1,8 kb der Promotorregionen der Gene cjun, junB, junD und cfos wurde in jeweils 10 RA- und OA-Gewebeproben, sowie in Proben von 5 normalen Kontrollen (4 NK und 1 GT) durchgeführt.

Im cjun-Promotor wurde in zwei RA-Proben eine bereits bekannte Insertion zwischen den Positionen -617 und -618 identifiziert (AG → ACAG; Literatur-Allelfrequenz 0,07) sowie eine bisher unbekannte Insertionsmutation zwischen den Positionen -823 und -824 in einer OA-Probe (AG → AAG). Bei der Sequenzierung dieser Probe wurde außerdem ein weiterer, bereits bekannter SNP an der Position -1676 identifiziert (CCA → CGA; Literatur-

Allelfrequenz 0,39), der mit dem NIRCA aufgrund seiner Lokalisation am äußeren Ende des untersuchten Fragments nicht identifiziert werden konnte. Dieser SNP wurde durch Pyrosequencing in dieser und weiteren Proben (siehe 3.8.2) bestätigt.

Im *junB*-Promotor wurde in jeweils zwei RA- und OA-Proben eine neue Mutation (GCA → GGA) an der Position -484 detektiert.

Die Mutationsanalyse des *junD*-Promotors führte innerhalb der ersten 1,8 kb nicht zur Detektion von neuen Mutationen; bekannte SNPs sind in dieser Region ebenfalls nicht vorhanden.

Im Promotor des Gens *cfos* wurden folgende Mutationen/SNPs entdeckt: ein bekannter SNP an der Position -60 (TCC → TTC; Literatur-Allelfrequenz 0,47) in 9 RA-Proben, 8 OA-Proben und 4 Normalkontrollen und ein weiterer bekannter SNP an der Position -135 (ATC → AAC; Literatur-Allelfrequenz 0,49) in 9 RA-, 8 OA- und 4 NK-Proben. Die Ergebnisse der Mutationsanalyse in der SM mittels NIRCA sind in der Tabelle 3 auf der folgenden Seite zusammengefaßt.

Als Beispiel für die Detektion von Spaltprodukten im Agarosegel nach Durchführung des NIRCAs ist in Abbildung 14 das Gel der Spaltung des ersten *cjun*-Promotor-Abschnittes (+260 bis -779) dargestellt, die zur Identifikation des SNPs an der Position -617/-618 führte.

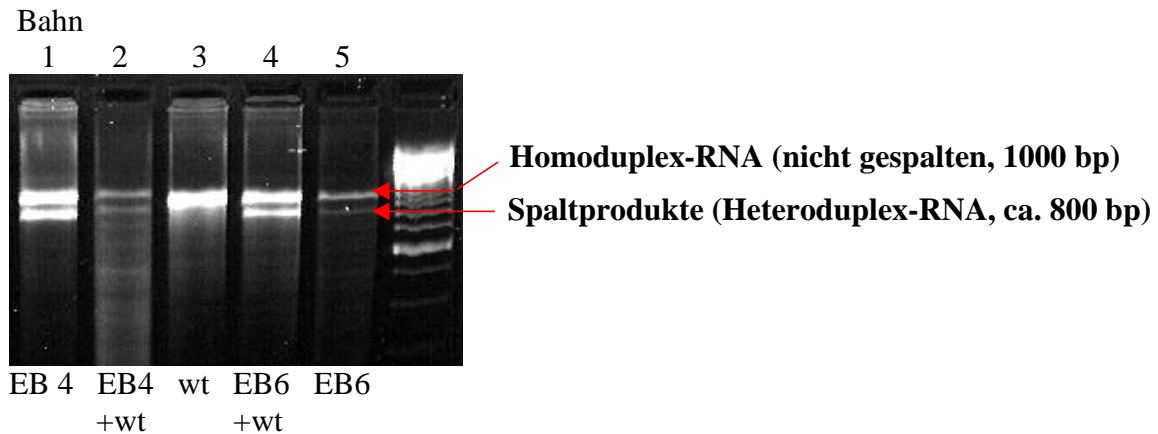


Abbildung 14: Agarosegel der Spaltung des *cjun*-Promotor-Abschnitts I.

Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Spaltung von Heteroduplex-RNA aus mutierten und wt-RNA-Strängen. Die reine wt-RNA auf Bahn 3 wurde nicht gespalten, die Mischung aus wt-RNA und mutierter Proben-RNA wurde im Falle der Heteroduplexbildung zwischen zwei verschiedenen Strängen gespalten, so daß sich eine zweite Bande im Gel nachweisen läßt (Bahnen 2 und 4). Das Auftreten einer zweiten Bande auch in den reinen Patienten-Proben-Ansätzen auf den Bahnen 1 und 5 deutet auf eine heterozygote Situation aus wt- und mutierten Allelen in den Proben hin.

Tabelle 3: Ergebnisse der Mutationsanalyse der jun- und fos-Promotoren in der SM mittels NIRCA und anschließender Sequenzierung (n. u.: nicht untersucht)

Patient	cjun		junB -484	cfos	
	-823/-824	-617/-618		-135	-60
RA:					
EB 3	wt	wt	wt	wt	wt
EB 4	wt	M*	wt	M*	M*
EB 6	wt	M*	wt	M	M
EB 7	wt	wt	wt	M*	M*
EB 20	wt	wt	wt	M	M
EB 23	wt	wt	M*	M*	M*
EB 25	wt	wt	wt	M*	M*
EB 26	wt	wt	M*	M*	M*
EB 27	wt	wt	wt	M	M
EB 28	wt	wt	wt	M*	M*
OA:					
EB 8	wt	wt	wt	M	M
EB 9	wt	wt	wt	M	M
EB 10	wt	wt	wt	wt	wt
EB 12	wt	wt	M*	M	M
EB 14	wt	wt	M*	M*	M
EB 15	wt	wt	wt	M	M
EB 17	wt	wt	wt	M	M
EB 18	wt	wt	wt	wt	wt
EB 22	wt	wt	wt	M*	M*
EB 24	M*	wt	wt	M	M
Normale:					
J 2	wt	wt	wt	wt	wt
NST 1	wt	wt	wt	M	M
NST 2	wt	wt	wt	M	M
NST 4	wt	wt	wt	M	M
NST 5	wt	wt	wt	M	M

Heterozygote Mutationen/SNPs sind mit einem Stern gekennzeichnet.

3.5.2 Analyse der identifizierten Mutationen im Blut und in SFB

Die in der SM identifizierten Mutationen/SNPs in den Promotoren der verschiedenen jun- und fos-Gene wurden in DNA-Proben aus Blut und SFB überprüft.

Im cjun-Promotor wurde die bekannte Insertion zwischen den Positionen -617 und -618 auch in den Blut- und SFB-Proben beider betroffener Patienten nachgewiesen; auch die erstmals beobachtete Insertionsmutation zwischen den Positionen -823 und -824 konnte in den Blut- und SFB-Proben des betroffenen OA-Patienten identifiziert werden.

Im junB-Promotor wurde die neue Mutation an der Position -484 in den Blutproben aller betroffenen Patienten und in jeweils einer RA- und OA-SFB-Probe bestätigt. Von den beiden restlichen Patienten lagen entweder keine SFB vor oder sie konnten aus technischen Gründen nicht analysiert werden.

Im cfos-Promotor wurden die SNPs an der Position -60 und -135 in Blutproben von 6 RA-Patienten und 5 OA-Patienten nachgewiesen, außerdem in den SFB-Proben von jeweils 3 RA- und OA-Patienten. Alle identifizierten Mutationen und SNPs liegen damit als Keimbahn-

Mutationen („germline“) vor. Die Ergebnisse der Mutationsanalysen in genomischer DNA aus Blut und SFB sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Ergebnisse der Mutationsanalyse im Blut und in SFB
(n. u.: nicht untersucht; n. v.: Blut-Probe nicht vorhanden/nicht amplifizierbar).

Patient	cjun		junB -484	cfos	
	-823/-824	-617/-618		-135	-60
RA:					
EB 3	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
EB 4 ¹	n. u.	M*	n. u.	n. v.	n. v.
EB 6 ¹	n. u.	M*	n. u.	n. v.	n. v.
EB 7	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
EB 20 ¹	n. u.	n. u.	n. u.	M	M
EB 23	n. u.	n. u.	M*	M*	M*
EB 25	n. u.	n. u.	n. u.	M*	M*
EB 26 ¹	n. u.	n. u.	M*	M*	M*
EB 27	n. u.	n. u.	n. u.	M	M
EB 28	n. u.	n. u.	n. u.	M*	M*
OA:					
EB 8	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
EB 9	n. u.	n. u.	n. u.	M	M
EB 10	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.
EB 12 ¹	n. u.	n. u.	M*	n. v.	n. v.
EB 14 ¹	n. u.	n. u.	M*	n. v.	n. v.
EB 15	n. u.	n. u.	n. u.	M	M
EB 17	n. u.	n. u.	n. u.	M	M
EB 18	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	
EB 22 ¹	n. u.	n. u.	n. u.	M*	M*
EB 24 ¹	M*	n. u.	n. u.	M	M
Normale:					
J 2	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
NST 1	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
NST 2	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
NST 4	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
NST 5	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.

Heterozygote Mutationen/SNPs sind mit einem Stern gekennzeichnet. Mit ¹ gekennzeichnete Proben wurden auch in SFB untersucht.

3.6 Funktionelle Analysen

3.6.1 Reportergen-Expression in Abhängigkeit vom vorgeschalteten Promotor (unstimulierte Zellen)

Um zu analysieren, ob und welche funktionellen Auswirkungen die mit dem NIRCA identifizierten Mutationen auf die Funktion des jeweiligen Promotors haben, wurde ihre funktionelle Bedeutung mithilfe von Reportergenkonstrukten überprüft. Das durch einen Leervektor verursachte Luziferase-Signal wurde als Nullwert eingesetzt. Dabei zeigte sich sowohl am ersten als auch am zweiten Tag nach der Transfektion, daß die mutierten Promotorvarianten im Vergleich zu den wt-Promotoren eine deutlich reduzierte Expression des Reportergens bewirken.

Eine nachweisbare Reportergen-Expression wurde durch die wt-Variante des cjun-Promotor-Abschnitts I hervorgerufen, obwohl dieser nur große Teile der 5'-UTR umfaßt (Position -1 bis -779), aber nicht den eigentlichen Kern-Promotor (ab -973). Durch die mutierte Variante des cjun-Promotors I (SNP an Position -617/-618) verringert sich diese Expression signifikant um ca. 80% (Abbildung 15 A auf der folgenden Seite).

Das gleiche Bild zeigt sich bei der Betrachtung der Luziferase-Expression in Abhängigkeit vom junB-Promotor I (-1 bis -842; Mutation an Position -484) bzw. vom cfos-Promotor I (-1 bis -468), der die miteinander gekoppelten SNPs -60 und -135 beinhaltet. Die mutierten Varianten beider Promotoren reduzieren die Reportergen-Expression signifikant um mehr als 90% (Abbildung 15 A).

Interessanterweise zeigt der cjun-Promotor II, der den eigentlichen (in der Literatur beschriebenen) Kern-Promotor und das 5'-Ende der 5'-UTR enthält (-619 bis -1736; Mutation an Position -823/-824 und SNP an Position -1676) weder in der wt-, noch in der mutierten Variante eine über die Leervektor-Transfektion (mock) hinausgehende Luziferase-Expression (Daten nicht gezeigt). Dies galt auch, wenn mutierte Varianten des Promotors transfiziert wurden, die nur die Mutation -823/-824 oder nur die Mutation -1676 aufwiesen. Da in allen Ansätzen eine deutliche Expression der Transfektionskontrolle Renilla-Luziferase gemessen wurde, ist ein Fehlschlag der Transfektion auszuschließen.

3.6.2 Reportergen-Expression in Abhängigkeit vom vorgeschalteten Promotor (Stimulierung der Zellen mit PMA)

Die Funktionsfähigkeit des jeweiligen Promotors wurde im gleichen System auch nach einer Stimulierung mit dem Phorbolester PMA untersucht. Dabei zeigte sich für den cjun-Promotor I (-1 bis -779; SNP an Position -617/-618) und den cfos-Promotor I (-1 bis -468; gekoppelte SNPs an Position -60 und -135) ein ähnliches Bild wie ohne Stimulierung. Sowohl nach dem ersten, als auch nach dem zweiten Tag wird die Expression des Reportergens durch die mutierten Promotorvarianten deutlich reduziert. Die Reduktion um mehr als 90% ist dabei im Falle von cjun sogar noch stärker als ohne Stimulierung (Abbildung 15 B auf der folgenden Seite).

Der schon während des unstimulierten Versuches aufgetretene Ausfall der Luziferase-Expression der wt- und der mutierten Variante des cjun-Promotors II (619 bis -1736; Mutation an Position -823/-824, SNP an Position -1676) konnte auch unter Stimulierung bestätigt werden.

Von den Ergebnissen des unstimulierten Versuches weicht nur der junB-Promotor I ab (-1 bis -842; Mutation an Position -484). Die mutierte Variante dieses Promotorabschnittes reduziert die Luziferase-Expression nach Stimulierung entweder gar nicht (nach einem Tag) oder wesentlich weniger deutlich (nur um ca. 45% nach dem zweiten Tag) als ohne

Stimulierung (Abbildung 15 B). Der Effekt dieser Mutation wird durch eine Stimulierung also zumindest zum Teil ausgeglichen.

Eine deutliche Reduktion der Aktivität der Promotoren von *cjun*, *junB* und *cfos* durch mutierte Varianten tritt also sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten Zellen auf. Nur die Aktivität der mutierten *junB*-Promotor-Variante wird unter Stimulierung weniger deutlich inhibiert.

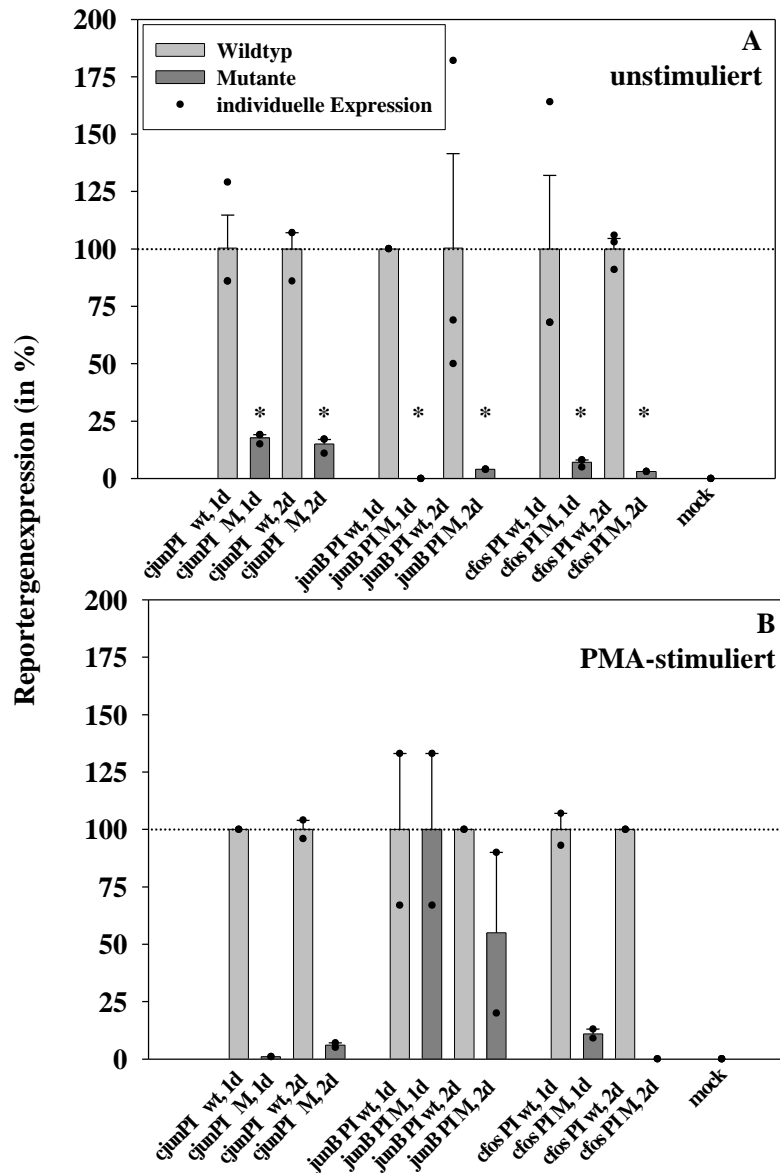


Abbildung 15: Reporter-Gen-Expression in Abhängigkeit vom vorgeschalteten Promotor, (A) in unstimulierten NIH-3T3-Zellen und (B) in PMA-stimulierten NIH-3T3-Zellen.

3.7 Analyse von Mutationen und SNPs mittels DNA-Microarray

3.7.1 Optimierung und Validierung des DNA-Microarrays

Nach der Identifizierung einer ganzen Reihe von funktionell aktiven Mutationen und SNPs sollte eine große Anzahl von Patienten bezüglich des Auftretens dieser Basenveränderungen untersucht werden. Dazu wurde im Rahmen des Jenaer Centrums für Bioinformatik und in Zusammenarbeit mit der Firma Clontech Chip Technologies ein DNA-Microarray entwickelt, der die Analyse dieser und weiterer, aus der Literatur bekannter Mutationen/SNPs ermöglichen sollte. Zur initialen Optimierung dieses DNA-Microarrays wurde der Chip RHEUMA_1 eingesetzt. Dieser enthält Sonden mit Mutationen und SNPs aus den codierenden Regionen und den Promotoren der Gene *cjun* und *cfos*. Das Chiplayout ist schematisch in Abbildung 16 dargestellt. Das exakte Chiplayout kann der Tabelle A8, die exakte Sondendefinition der Tabelle A10 (Anhang, Seiten xxxvii und xxxviii) entnommen werden.

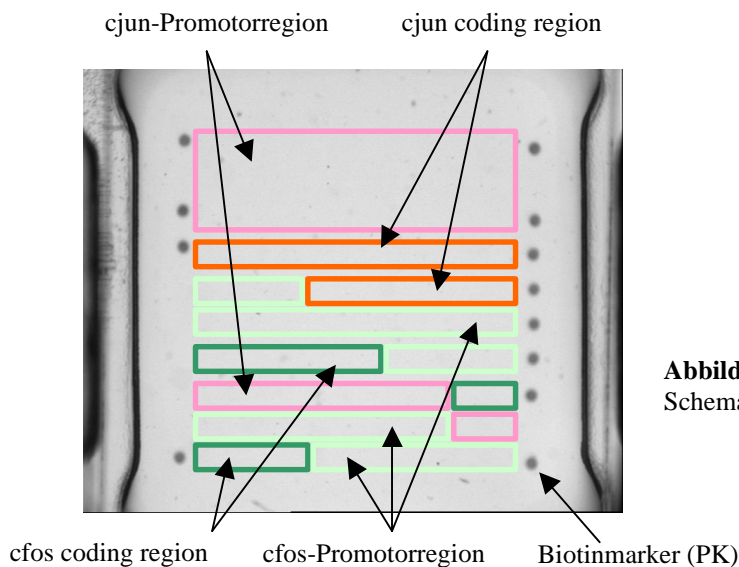


Abbildung 16:
Schematische Darstellung des RHEUMA_1-Layouts.

Als erster Schritt zur Optimierung des DNA-Microarrays wurden zunächst die vom Hersteller empfohlenen Versuchsbedingungen eingesetzt. Da dieser initiale Versuch mit einer 2-stündigen Hybridisierungsdauer und einer Markierung der Proben mit einem Streptavidin-Goldkonjugat fehlschlug, wurden die Versuchsparameter variiert (siehe Tabelle A13, Seite xliv). Dadurch wurde eine erfolgreiche Hybridisierung der Proben mit den Sonden auf dem DNA-Microarray und eine detektierbare Markierung der gebundenen Proben erreicht. So wurden die Fragmente mit einer asymmetrischen PCR und mit einer doppelten bdUTP-Konzentration hergestellt, SSPE als Hybridisierungspuffer eingesetzt, die Hybridisierung über 16 h bei 50°C und 400 rpm durchgeführt und die Konzentration der Blockierungslösung auf 10% FCS reduziert. Außerdem wurde zur Markierung nun ein Streptavidin-HRP-Konjugat eingesetzt (Inkubation für 25 min bei 30°C und 550 rpm). Unter diesen Bedingungen gelang es, die Probe mit den komplementären Spots erfolgreich, spezifisch und reproduzierbar zu hybridisieren und zu markieren. Die Diskriminierung zwischen wt- (starke Färbung) und mutierten Spots (schwache Färbung) zeigt, daß zwar eine leichte Kreuzreaktivität zwischen einer Probenspezies (hier: wt) und den beiden Sondenvarianten (wt und mutiert) auftritt, die Reaktion mit der korrekten Sonde jedoch deutlich stärker und damit gut auswertbar ist. Nur eine Position (cjun +211) konnte nicht hybridisiert/markiert werden, da für sie die Versuchsbedingungen nicht optimal waren. Dieses Problem konnte jedoch durch die Wahl alternativer Bedingungen gelöst werden (siehe unten). Analoge Ergebnisse konnten auch bei der Optimierung der DNA-Fragmente für die codierende Region von cfos erzielt werden. Die erfolgreiche Hybridisierung/Markierung für die cjun-Proben ist in Abbildung 17 dargestellt.

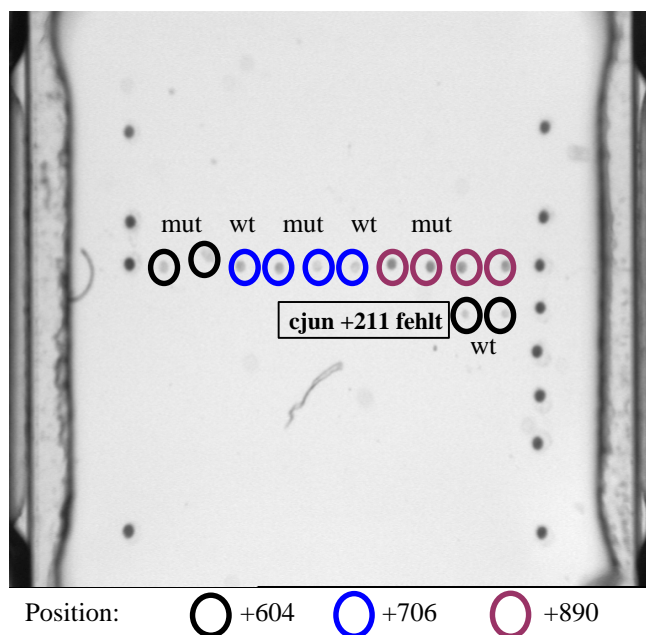


Abbildung 17:
Erfolgreiche Hybridisierung der cjun-wt-Probe
mit den cjun-wt-Sonden.
(wt: Wildtyp, mut: Mutante/SNP)

Durch den Einsatz von 3DNA als Hybridisierungspuffer und eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur auf 56°C konnte auch ein Gemisch aus DNA-Fragmenten mit den cjun-Promotorregionen I (+260 bis -779) und II (-619 bis -1736) erfolgreich mit den komplementären Sonden auf dem Array hybridisiert werden. Die in den Fragmenten vorliegende wt-Variante an den Positionen cjun -1149, -1218, -1274 und -1351 konnte in allen Fällen korrekt identifiziert und von der mutierten Variante unterschieden werden. Gleiches gilt für die mutierte Variante an der Position -1676 im cjun-Promotor II-Fragment, deren Färbung deutlich intensiver als die wt-Variante ist. Außerdem konnte der im cjun-Promotor I-Fragment enthaltene wt unter den neuen Versuchsbedingungen an der Position +211 nachgewiesen werden. Die korrekte Diskriminierung zwischen den wt- bzw. mutierten Varianten ist der Abbildung 18 entnehmbar.

An allen Positionen wurde korrekt nach wt und mut unterschieden

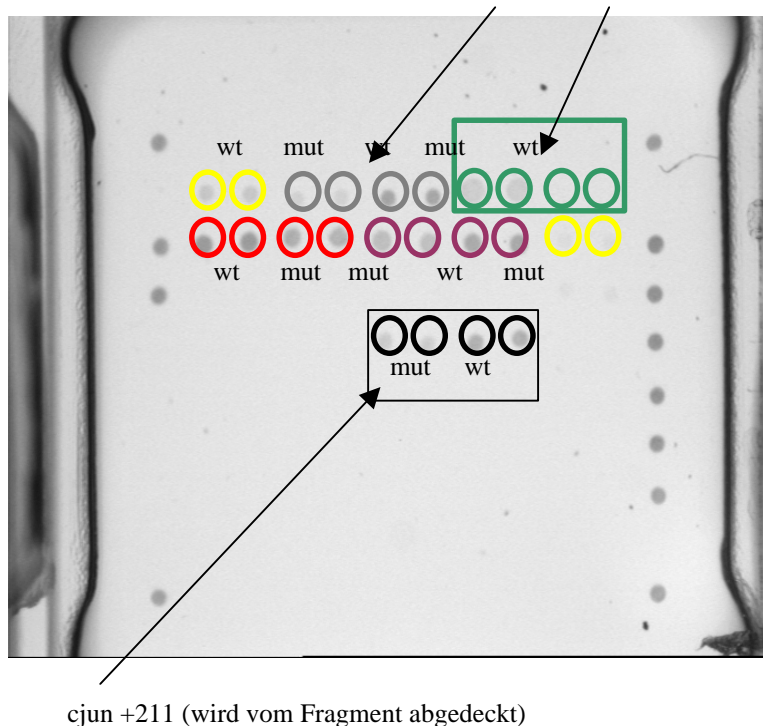


Abbildung 18:

Korrekte Diskriminierung zwischen wt- und mutierten Basenvarianten an diversen cjun-Promotor-Positionen. (wt: Wildtyp, mut: Mutante/SNP)

Als abschließender Validierungsschritt wurde bei der Hybridisierung ein Gemisch aus zwei DNA-Fragmenten eingesetzt, die beide die codierende Region von cjun abdeckten, an der Position +604 aber entweder den wt oder die mutierte Basenvariante enthielten. Dabei wurden Mischungen aus wt und Mutante im Verhältnis 50%/50%, 25%/75%, 90%/10% und 95%/5% eingesetzt. Die Auswertung dieser Versuche ergab, daß der Microarray Mischungen aus wt und Mutante in einem Verhältnis von jeweils 50% (entsprechend einer heterozygoten Situation) noch zuverlässig detektieren kann (siehe Abbildung 19). Bei größeren Unterschieden in der Fragmentkonzentration konnte bisher keine verlässliche Diskriminierung erreicht werden, da sich die Markierung dann nicht vom Hintergrundsignal abhebt, das

aufgrund der leichten Kreuzreaktivität der Proben mit wt- und mutierten Sondenspots entsteht.

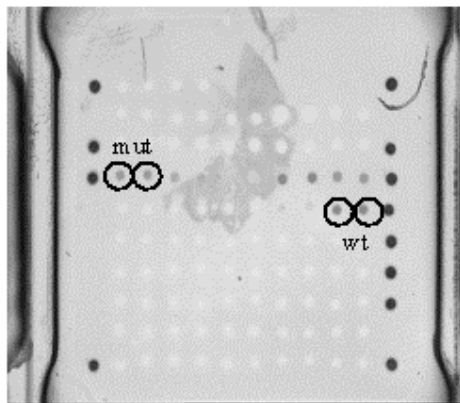


Abbildung 19:

Korrekte Identifizierung eines heterogenen Gemisches aus wt- und mutierten Fragmenten (50%/50%) bezüglich der Position +604; korrekte Detektion des wt an allen anderen Positionen. (wt: wildtyp, mut: Mutante/SNP)

Die nach verschiedenen Schritten optimierten Versuchsparameter für die einzelnen DNA-Fragmente sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5: Probenspezifische Microarray-Versuchsbedingungen

Probe	Hybridisierungspuffer	Hybridisierungstemperatur	Entwicklungszeit
cjun codierende Region	SSPE	50°C	3 min
cfos codierende Region	3DNA	45°C	6 min
cjun Promotor I	3DNA	50°C	3 min
cjun Promotor II	SSPE	50°C	12 min
junB Promotor I	3DNA	45°C	12 min

3.7.2 Häufigkeit der analysierten Mutationen/SNPs in NK-, OA- und RA-Proben

Nach der Optimierung und Validierung des Microarrays mit DNA-Fragmenten, die aus Plasmiden amplifiziert wurden, sollte der Microarray zur Analyse von jeweils 50 NK-, OA- und RA-Proben dienen. Dazu wurde eine Weiterentwicklung des ursprünglichen Chip-Designs eingesetzt, der DNA-Microarray RHEUMA_3. Das Chiplayout ist schematisch in Abbildung 20 auf der folgenden Seite dargestellt, das exakte Chiplayout kann der Tabelle A9, die Sondendefinition der Tabelle A10 entnommen werden (Anhang, Seiten xxxvii und xl).

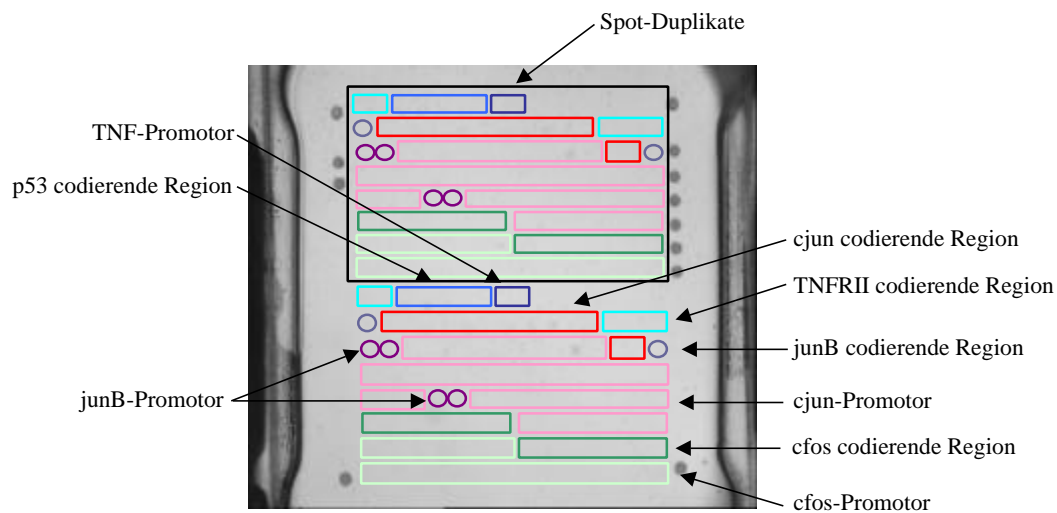


Abbildung 20: Schematische Darstellung des RHEUMA_3-Layouts.

Die Amplifizierung der als Probe auf den Chip gegebenen DNA-Fragmente erfolgte hierbei aus Blut-DNA. Amplifiziert wurden Fragmente der codierenden Regionen von cjun und cfos sowie Fragmente der Promotor-Abschnitte I und II von cjun und des Promotor-Abschnittes I von junB und cfos. Das prinzipielle Funktionieren des Microarrays konnte in einer Reihe von aus Blut-DNA amplifizierten Proben nachgewiesen werden, wie die Abbildungen 21 bis 24 (folgende Seite) für die codierenden Regionen von cjun und cfos, sowie die Promotorregionen I und II von cjun zeigen. Bei der Analyse aller Fragmente wurde jedoch deutlich, daß eine Übertragung der Versuchsbedingungen aus den Vorversuchen mit Plasmid-Amplifikaten auf die aus dem Blut amplifizierten DNA-Fragmente der Patienten nicht in allen Fällen möglich war. Nur ein Teil der zur Hybridisierung eingesetzten Fragmente konnte nachgewiesen werden. Insgesamt waren nur ca. 15% der Versuche auswertbar. Trotzdem konnte das Auftreten von Mutationen/SNPs in der Promotor-Region I und der codierenden Region von cjun in jeweils 5 RA-, 5 OA- und 15 NK-Proben ausgewertet werden. Die Ergebnisse der Mutationen/SNPs, die in diesen Regionen am besten ausgewertet werden konnten (cjun -526, -174, -32 bzw. +706, +750 und +890), sind in der Tabelle 6 (Seite 73) dargestellt. Die gute Qualität und Auswertbarkeit der positiven Versuche (siehe auch Abbildungen 21 bis 24) zeigt allerdings, daß diese Probleme wahrscheinlich durch weitere Optimierungsschritte gelöst werden können. Momentan werden dazu Tests zur Anpassung der Versuchsbedingungen (Variation von Hybridisierungspuffer/-temperatur und Streptavidin-HRP-Konzentration), zur Verkürzung der eingesetzten DNA-Fragmente und zur Erhöhung ihrer Konzentration durch eine konventionelle PCR vor der asymmetrischen Amplifikation durchgeführt.

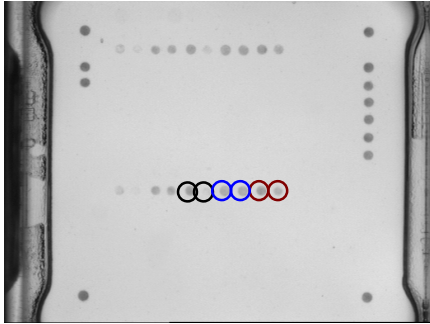


Abbildung 21:
Hybridisierung der codierenden Region
von cjun (spezifisch).

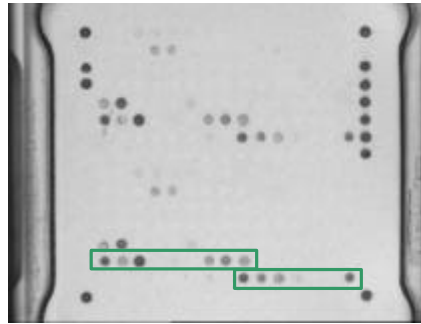


Abbildung 22:
Hybridisierung der codierenden Region
von cfos (leichte Kreuzreaktion mit anderen Sonden).

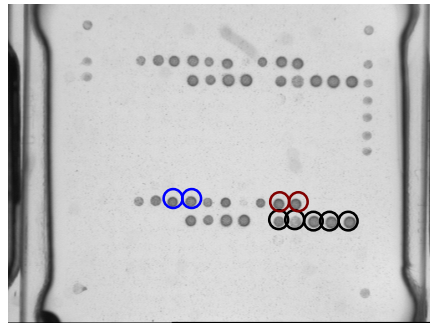


Abbildung 23:
Hybridisierung der Promotor-Region I
von cjun (spezifisch).

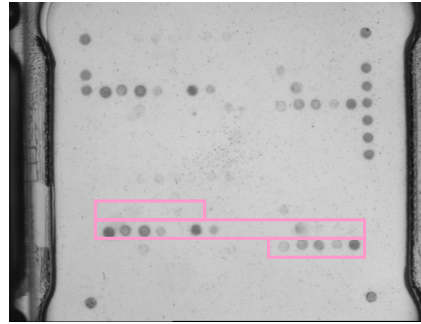


Abbildung 24:
Hybridisierung der Promotor-Region II
von cjun (spezifisch).

In den Abbildungen 21 und 23 sind die in 5 RA-, 5 OA- und 15 NK-Proben ausgewerteten Mutationen/SNPs markiert. Abbildung 21: ● : cjun +706, ● : cjun +750, ● : cjun +890.

Abbildung 23: ● : cjun -526, ● : cjun -174, ● : cjun -32.

In Abbildung 22 und 24 sind die Sonden für die codierende Region von cfos bzw. für die cjun Promotor-Region II markiert.

Bei der Auswertung der in Tabelle 6 (Seite 73) dargestellten Ergebnisse zeigte sich, daß die Mutation an der Position +706, die zu einem Austausch von Prolin zu Serin führt (242), erwartungsgemäß sehr selten auftritt (nur in einer NK-Probe). Beim Vergleich der auftretenden Allelfrequenzen gibt es allerdings deutliche Unterschiede zwischen der analysierten Probenpopulation und den Literaturwerten. So treten die SNPs -526 und -147 in allen Gruppen deutlich häufiger auf (beide in allen Gruppen ca. 0,4) als der Literaturwert erwarten läßt (0,02). Der SNP -32, der nur in einer Frequenz von 0,02 auftreten soll, ist nur in der RA nicht nachweisbar, tritt in OA- und NK-Proben aber mit einer Frequenz von 0,5 bzw. 0,43 auf. Dies könnte auf einen protektiven Effekt dieses SNPs hindeuten. Der SNP +750 tritt nur in den RA-Proben in einer Frequenz auf, die dem Literaturwert entspricht (0,1). NK-Proben weisen hingegen eine leicht erhöhte (0,3) und OA-Proben sogar eine stark erhöhte Frequenz auf (0,7). Für den SNP +890 spiegelt sich der Literaturwert von <0,01 in den RA-Proben wider, während OA- und NK-Proben erhöhte Frequenzen aufweisen (0,38 bzw. 0,2). Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die untersuchte Probenpopulation entweder nicht repräsentativ ist, oder die in der Literatur beschriebenen Frequenzen zu niedrig angesetzt sind.

Tabelle 6: Mutations-Analyse der Promotor-Region I und der codierenden Region von *cjun* mit dem DNA-Microarray RHEUMA_3.

Probe	Klassifikation	<i>cjun</i> -526	<i>cjun</i> -174	<i>cjun</i> -32
KIM 43	RA	M*	M	wt
KIM 49	RA	M*	wt	wt
KIM 55	RA	wt	-	-
KIM 64	RA	M*	wt	-
KIM 65	RA	M*	-	-
EB 10	OA	wt	wt	M
EB 13	OA	M	M	M
EB 17	OA	wt	wt	wt
EB 57	OA	M*	M	-
EB 61	OA	M*	wt	wt
TFM 25	NK	M*	-	M
TFM 26	NK	wt	-	wt
TFM 27	NK	M*	wt	M*
TFM 28	NK	M*	wt	M*
TFM 33	NK	wt	wt	M*
TFM 35	NK	wt	wt	wt
TFM 36	NK	M*	M	M*
TFM 43	NK	M*	M*	M*
TFM 49	NK	M*	wt	M
TFM 52	NK	M*	M	wt
TFM 53	NK	M	-	M*
TFM 56	NK	M*	M*	wt
TFM 57	NK	wt	-	wt
TFM 58	NK	wt	M	M*
TFM 59	NK	wt	M*	M
Probe	Klassifikation	<i>cjun</i> +706	<i>cjun</i> +750	<i>cjun</i> +890
KIM 43	RA	wt	wt	wt
KIM 47	RA	wt	wt	wt
KIM 49	RA	wt	-	-
KIM 55	RA	wt	M*	wt
KIM 63	RA	wt	wt	
EB 66	OA	wt	M*	wt
EB 69	OA	wt	wt	M*
EB 76	OA	wt	M	M
EB 79	OA	wt	M	wt
EB 83	OA	wt	M	-
TFM 25	NK	wt	wt	wt
TFM 26	NK	wt	wt	wt
TFM 27	NK	wt	M*	M
TFM 28	NK	wt	M*	M*
TFM 29	NK	wt	M*	wt
TFM 30	NK	M	M*	wt
TFM 31	NK	wt	wt	M*
TFM 32	NK	wt	M*	wt
TFM 33	NK	wt	wt	wt
TFM 36	NK	wt	wt	wt
TFM 38	NK	wt	wt	wt
TFM 42	NK	wt	M*	wt
TFM 44	NK	wt	wt	M*
TFM 52	NK	wt	M*	wt
TFM 54	NK	wt	M	M*

Heterozygote Mutationen sind mit einem Stern gekennzeichnet, - : nicht auswertbar.

3.8 Pyrosequencing

3.8.1 Validierung des Pyrosequencings

Parallel zur Entwicklung und Optimierung des DNA-Microarrays wurde als alternative Methode zur Analyse größerer Patientenzahlen das Pyrosequencing getestet. Diese Methode ist zwar nur zur Analyse von jeweils einer Mutation pro Ansatz geeignet, hat aber den Vorteil, eine zuverlässige und etablierte Technik zu sein. Die Sensitivität des Pyrosequencings wurde anhand von bekannten bzw. mittels NIRCA neu identifizierten Mutationen/SNPs überprüft.

Die Validierung des Pyrosequencings zeigte, daß sich die untersuchten und in der Literatur als häufig beschriebenen SNPs in einem kommerziell erhältlichen DNA-Pool aus 80 bis 100 Individuen nachweisen lassen, wenn auch mit einer unterschiedlichen Allelfrequenz. Der SNP *cjun* -1676 (G/C), der laut Literatur in einer Allelfrequenz von 0,39 verbreitet ist, konnte nur mit einer Frequenz von 0,12 nachgewiesen werden. Bei den untersuchten *cfos* SNPs konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden: der SNP *cfos* -135 (T/A) war in einer Frequenz von 0,28 (Literatur: 0,49) und der SNP *cfos* -60 (C/T) in einer Frequenz von 0,3 (Literatur: 0,47) vertreten. Die Abweichungen von der in der Literatur ausgewiesenen Allelfrequenz sind dabei vermutlich auf die Zusammensetzung dieses speziellen DNA-Pools und nicht auf einen Mangel in der Methode zurückzuführen.

Bei der Überprüfung einer zu Testzwecken analysierten Mutation, der Deletion eines Basentriplets im Gen *cjun* an der Position +604 bis +606 (ein CAG innerhalb eines 5 x CAG-Clusters), die aus den beiden RA-Proben EB 6 und EB 26 bekannt ist (242), schlug das Pyrosequencing fehl, da bei der Analyse der DNA-Sequenz weder die mutierte (nur 4 x CAG) noch die wt-Variante (5 x CAG) detektiert wurde. Stattdessen wurde in der betroffenen Region ein 6 x CAG-Cluster detektiert, der sich nicht durch konventionelle Sequenzierung bestätigen ließ. Dieses Phänomen ist bisher in der Literatur unbekannt. Alle anderen Mutationen/SNPs konnten allerdings korrekt identifiziert werden.

3.8.2 Pyrosequencing der codierenden Regionen und der Promotoren von *cjun* und *cfos*

Da die Validierung des Pyrosequencings insgesamt erfolgreich verlief, wurde diese Methode eingesetzt, um eine größere Anzahl von Proben im Hinblick auf das Auftreten bestimmter Mutationen/SNPs zu untersuchen. Zwei der untersuchten SNPs (*cjun* -1676 und *cjun* -1710) dienten als Kontrolle der Probenpopulation im Hinblick auf die Allelfrequenz; damit sollte überprüft werden, ob die Population die aus der Literatur bekannte Allelfrequenz aufweist.

Die bei der Validierung des Pyrosequencings (siehe 3.5.1) aufgetretene falsch positive Detektion eines 6 x CAG-Clusters in der codierenden Region von *cjun* trat auch beim Pyrosequencing aller SM-Proben auf. Die SNPs an den Positionen *cfos* -135 und -60 wurden hingegen in allen Proben korrekt identifiziert. Der in der Probe EB 24 identifizierte SNP an

der Position cjun -1676 konnte ebenfalls korrekt in dieser Probe nachgewiesen und darüber hinaus in weiteren Proben identifiziert werden (siehe Tabelle 7, folgende Seite). Das Pyrosequencing ist also als Methode zur Detektion bereits bekannter Mutationen/SNPs in neuen Proben gut geeignet. Bei der Überprüfung der Probenpopulation im Hinblick auf die Allelhäufigkeit wurde der SNP cjun -1676 mit einer Allelhäufigkeit von 0,56 in der gesamten Probenpopulation bestimmt; dieser SNP trat also etwas häufiger auf, als aufgrund des Literaturwertes erwartet wurde (0,39). Der SNP cjun -1710 war hingegen leicht unterrepräsentiert mit einer Häufigkeit von 0,31 (statt 0,4) in allen Proben. Die funktionell relevanten SNPs cfos -60 und cfos -135 traten mit einer Allelfrequenz von 0,72 bzw. 0,67 in der gesamten Probenpopulation auf. Damit sind die Allelfrequenzen beider SNPs gegenüber dem Literaturwert (0,47 bzw. 0,49) deutlich erhöht.

Zwischen den einzelnen Patienten- und Kontrollgruppen bestehen allerdings große Unterschiede. So tritt der SNP cjun -1676 in RA-Patienten mit einer Allelfrequenz von 0,53 auf, in OA sogar mit 0,62, in NK-/GT-Proben hingegen nur mit einer Frequenz von 0,44. Beim SNP cjun -1710 beträgt die Allelfrequenz in der RA dagegen nur 0,27 und nimmt über die OA-Proben (0,32) zu den NK-/GT-Proben hin zu (0,37). Bei den funktionell relevanten SNPs cfos -60 und -135 zeigt sich ebenfalls eine spezifische Allelfrequenz der Probenpopulationen. Die höchste Allelfrequenz des SNPs cfos -60 tritt in NK/GT auf (0,72), während RA und OA fast identische Frequenzen aufweisen (0,6 bzw. 0,65). Der SNP cfos -135 konnte durch das Pyrosequencing mit einer Allelfrequenz von 0,67 in NK/GT bestimmt werden und in RA- und OA-Proben mit 0,68 bzw. 0,71. Die funktionell relevanten SNPs treten also in allen Gruppen gehäuft auf. Interessanterweise treten sie in den normalen Kontrollen in den höchsten Frequenzen auf. Da die Gruppe der NK-/GT-Proben mit 9 Individuen aber relativ klein ist, könnte es sich um eine zufällige, nicht repräsentative Häufung handeln. Daß sich schon bei der Analyse einer mittleren Probenzahl (RA: 27, OA: 30, NK: 9) deutliche Unterschiede zwischen den Probenpopulationen nachweisen lassen, besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, daß bestimmte Mutationen/SNPs mit dem Auftreten rheumatischer Erkrankungen assoziiert sind. Aufgrund der mittels Pyrosequencing bestimmten Allelfrequenzen muß allerdings davon ausgegangen werden, daß der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen maximal 10% beträgt. Unter Berücksichtigung der χ^2 -Tabelle (243) erfordern diese Allelfrequenz und die erwarteten Unterschiede die Untersuchung von bis zu 500 Patienten/Spendern. Deshalb wird zurzeit ein entsprechender Proben-Pool aufgebaut (jeweils 200 Proben pro Gruppe liegen bereits vor) und die Durchführung entsprechender Analysen vorbereitet. Die Publikation der komplettierten Daten ist zeitnah zum Abschluß der Studie geplant.

Tabelle 7: Ergebnisse des Pyrosequencings (n. u.: nicht untersucht)

Probe	Klassifikation	cfos -135 wt: T, M: A	cfos -60 wt: C, M: T	cjun -1710 wt: C, M: T	cjun -1676 wt: C, M: G
EB 3	RA	wt	wt	M	wt
EB 6	RA	M	M	wt	M
EB 7	RA	M*	M*	M	wt
EB 20	RA	M	M	wt	M*
EB 23	RA	M*	M*	M*	M*
EB 25	RA	M*	M*	M*	M*
EB 26	RA	M*	M*	wt	M*
EB 27	RA	M	M	wt	M*
EB 28	RA	M*	M*	wt	M*
EB 31	RA	M	M	M*	n. u.
EB 35	RA	M*	M*	wt	M
EB 40	RA	M*	M*	M*	M*
EB 41	RA	M*	M*	M*	M*
EB 50	RA	M	M	wt	M*
EB 53	RA	M	M	wt	M*
EB 88	RA	M	M	M*	M*
EB 89	RA	wt	wt	wt	n. u.
EB 96	RA	M	M	wt	M*
EB 133	RA	M	M	M*	M*
EB 137	RA	M	M	wt	M
EB 141	RA	M*	M*	wt	M
EB 146	RA	M	M	M	wt
EB 148	RA	M	M	wt	M
EB 149	RA	M*	M*	M*	M*
EB 153	RA	M*	M*	M*	M*
EB 159	RA	M*	M*	wt	M
EB 164	RA	M	wt	wt	M

EB 8	OA	M	M	M*	M*
EB 9	OA	M	M	M*	M*
EB 10	OA	wt	wt	M*	n. u.
EB 12	OA	M	M	M*	M*
EB 13	OA	M	M	M*	M*
EB 15	OA	M	M	M*	M*
EB 16	OA	M	M	wt	M
EB 17	OA	M	M	wt	M*
EB 18	OA	wt	wt	M*	M*
EB 19	OA	wt	wt	n. u.	n. u.
EB 21	OA	wt	wt	M*	M*
EB 22	OA	M*	M*	M*	M*
EB 24	OA	M	M	wt	M*
EB 29	OA	M	M	M*	M*
EB 43	OA	M	M	wt	M*
EB 45	OA	M	M	wt	M
EB 134	OA	M	M	wt	M
EB 139	OA	M	M	wt	M
EB 140	OA	wt	wt	wt	M
EB 143	OA	wt	wt	M*	M*
EB 144	OA	M*	M*	M	wt
EB 145	OA	M*	M*	M*	M*
EB 147	OA	M*	M*	wt	M
EB 150	OA	M	M	M*	M*
EB 151	OA	M*	M*	M*	M*
EB 154	OA	M	M	wt	M
EB 155	OA	M	M	M*	M*
EB 156	OA	wt	wt	M*	M*
EB 157	OA	M	M	M*	M*
EB 161	OA	M	wt	wt	M
EB 162	OA	M	wt	n. u.	M

J 1	NK/GT	M*	M*	M*	M*
J 2	NK/GT	n. u.	n. u.	M*	M*
J 4	NK/GT	M	M	M*	M*
J 5	NK/GT	M	M	M	wt
NST 1	NK/GT	M	M	M*	n. u.
NST 2	NK/GT	M	M	n. u.	M*
NST 3	NK/GT	M*	M*	wt	M
NST 4	NK/GT	M	M	wt	M*
NST 5	NK/GT	M	M	M*	M*

Heterozygot auftretende Mutationen sind mit einem Stern gekennzeichnet.

3.9 *In silico* Analysen

Bei der Analyse des Konservierungsgrades der jun- und fos-Gene und –Promotoren, die von Frau Dr. U. Gausmann und Herrn Dr. K. Szafranski mit dem Programm „multi percentage identity plot“ durchgeführt wurde, wird eine 100%-ige Konservierung einer Position mit dem Wert 0 gekennzeichnet. Negative Werte (bei den jun-/fos-Genen bis maximal -2,2) kennzeichnen einen geringeren Konservierungsgrad.

Die Analysen zeigten, daß die identifizierten Mutationen und SNPs im cjun-Promotor nicht in konservierten Regionen lokalisiert sind. Die Analyse des Gens cjun von der Position –4738 bis zur Position +2762 ergab einen durchschnittlichen Konservierungswert von -0,88 (siehe Abbildung 25 auf der folgenden Seite; aufgrund der Darstellung gemittelter Werte sind die Einzelwerte der Positionen nicht unmittelbar ablesbar). Im Vergleich dazu wiesen die Positionen der Promotor-Mutationen und -SNPs geringere Werte auf. Der bekannte SNP cjun -617/-618 weist einen Konservierungswert von -1,71 auf, die Mutation cjun -823/-824 ebenfalls einen Wert von -1,71 und der mittels Pyrosequencing analysierte SNP -1710 einen Wert von -1,64. Lediglich der SNP cjun -1676 wies einen etwas höheren Konservierungswert von -0,32 auf.

Das Gen junB, das von von der Position –5084 bis zur Position +2253 analysiert wurde, weist einen Durchschnittswert von -0,63 auf (siehe Abbildung 26 auf der folgenden Seite). Interessanterweise zeigt die Mutation an der Position -484 im junB-Promotor eine 100%-ige Konservierung unter den analysierten Spezies, da sie einen Konservierungswert von 0 aufweist. Von den in den jun-Genen identifizierten Mutationen und SNPs ist also nur die Mutation junB -484 besonders stark konserviert.

Die Analyse von cfos, die von –3000 bis +10000 durchgeführt wurde, zeigte ebenfalls negative Konservierungswerte (siehe Abbildung 27 auf Seite 81). Die SNPs an den Positionen -60 und -135 weisen nur einen Wert von –0,3 bzw. –0,2 auf.

Allerdings zeigte sich, daß die bisher bekannten Transkriptionsfaktor-Bindestellen der jun- und fos-Gene auch nicht in konservierten Regionen lokalisiert sind (siehe Abbildung 27B für cfos). Darüber hinaus sind auch starke Schwankungen des Konservierungsgrades innerhalb der codierenden Sequenz zu beobachten. Relativ hohe Werte erreichen in der Regel nur die ersten beiden Basen eines Basentriplets, bei der dritten Position treten dagegen niedrigere Konservierungswerte auf. Funktionell relevante Sequenzen müssen sich also nicht zwangsläufig in hochkonservierten Regionen befinden.

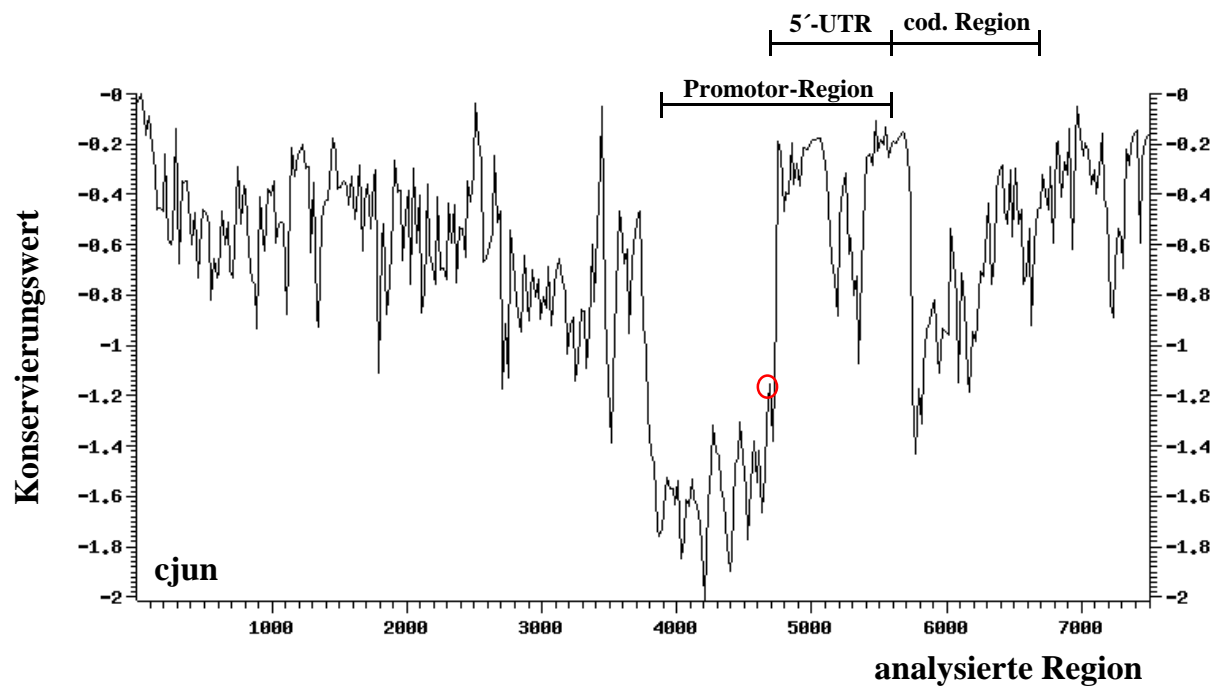


Abbildung 25: Konservierungsanalyse des Promotors und der codierenden Region von cjun.
Die Lokalisation bekannter Transkriptionsfaktor-Bindestellen ist mit einem Kreis gekennzeichnet.

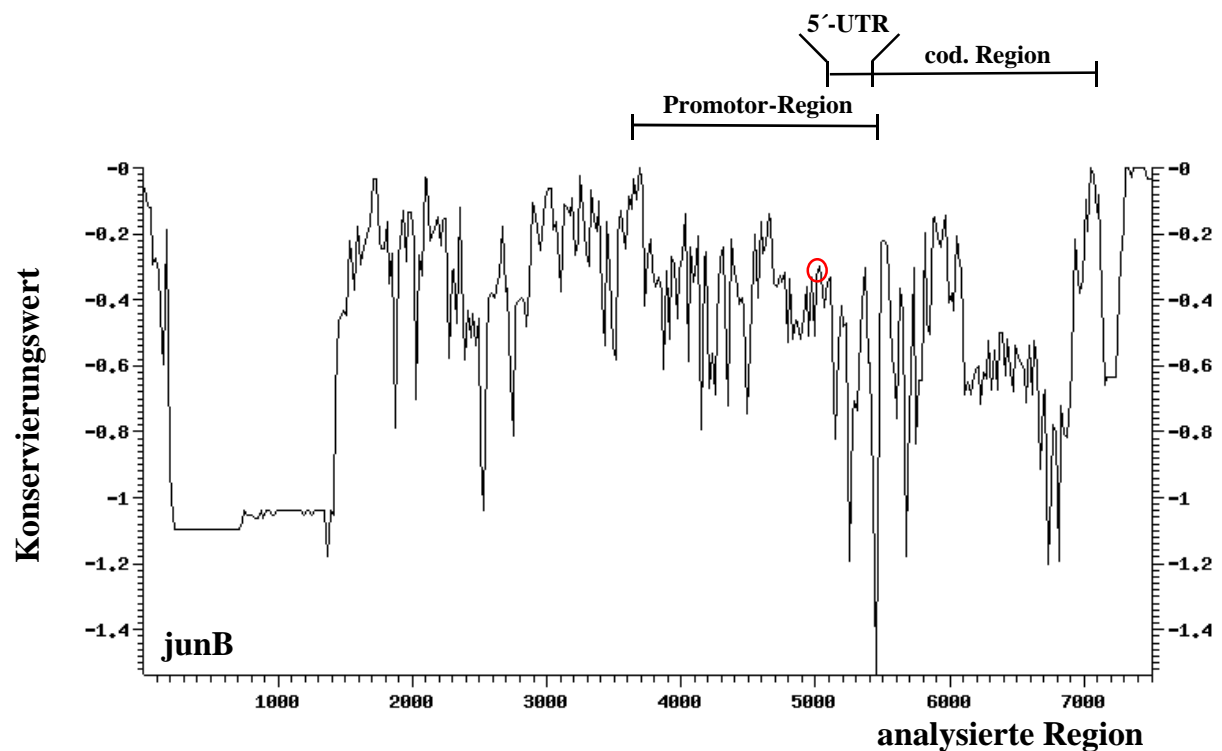


Abbildung 26: Konservierungsanalyse des Promotors und der codierenden Region von junB.
Die Lokalisation bekannter Transkriptionsfaktor-Bindestellen ist mit einem Kreis gekennzeichnet

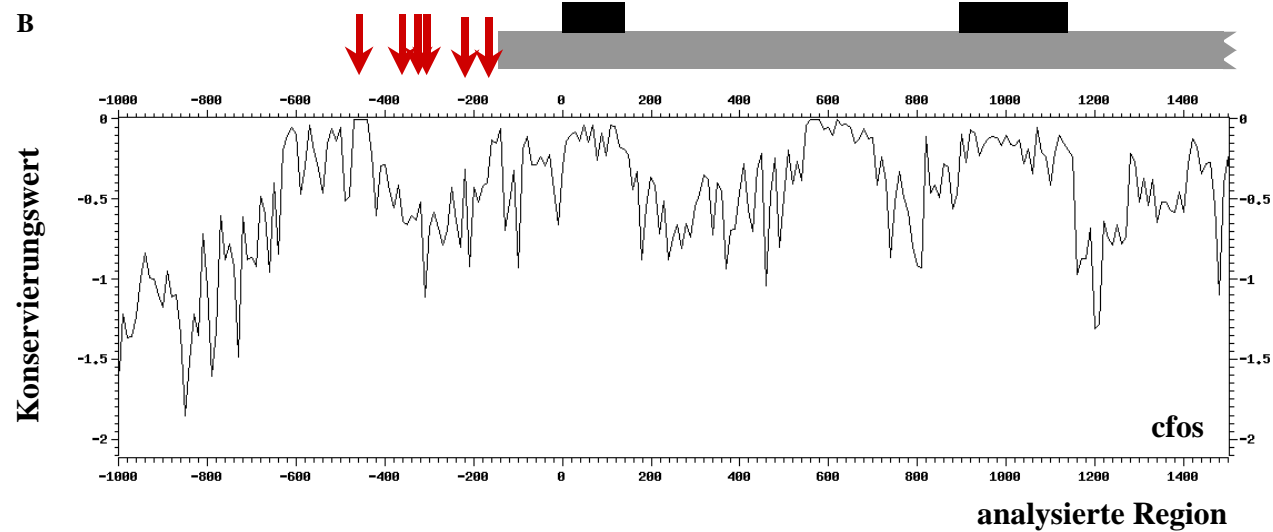
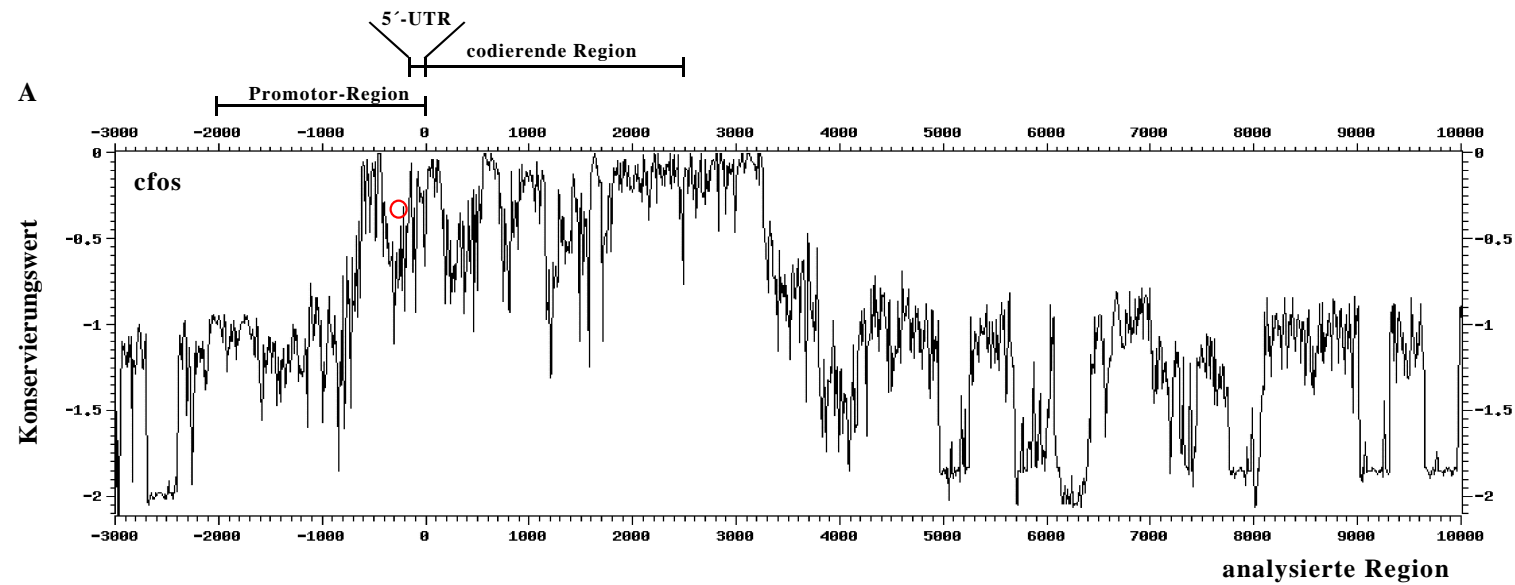


Abbildung 27: Konservierungsanalyse des Promotors und der codierenden Region von *cfos*.

- (A) Übersicht über die gesamte analysierte Region (-3000 bis +10000). Die Lokalisation bekannter Transkriptionsfaktor-Bindestellen ist mit einem Kreis gekennzeichnet.
- (B) Ausschnitt der analysierten Region von *cfos* zwischen -1000 und +1500. Der Abschnitt, der die mRNA umfaßt, ist grau gekennzeichnet, Exons sind schwarz gekennzeichnet. Die Pfeile kennzeichnen die bekannten Transkriptionsfaktor-Bindestellen.

4. Diskussion

4.1 Analyse der jun- und fos-Genexpression

Viele der für die RA charakteristischen Veränderungen synovialer Fibroblasten, wie hohe MMP-Expression (33), Kollagen-Produktion (35) und verstärkte Zytokin-Expression (23), sind von der Aktivierung durch den Transkriptionsfaktor AP-1 abhängig. Da ein ursächlicher Einfluß von AP-1 auf diese abnormen zellulären Vorgänge höchst wahrscheinlich ist und in der Literatur eine erhöhte AP-1-Aktivität in der RA gut belegt ist (52;70;105), ist die Klärung des Expressionsverhaltens der Jun- und Fos-Untereinheiten von AP-1 für das Verständnis der Pathogenese der RA von großem Interesse. Obwohl schon seit vielen Jahren Expressionsstudien über die jun- und fos-Gene veröffentlicht werden, ist die Rolle der jun- und fos-Expression in der RA nicht abschließend geklärt. Zum einen konzentrieren sich viele Studien nur auf die mRNA-Expression (50;52), ohne die Proteinexpression zu überprüfen, und ignorieren so die Ebene der Genexpression, die für die funktionellen Auswirkungen in der Zelle verantwortlich ist. Zum anderen widersprechen sich die Befunde bezüglich der gemessenen Stärke der mRNA-Expression, insbesondere im Vergleich zu Osteoarthrose- oder Normalkontrollen (29;40;50;52;53). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA- und die Proteinexpression der jun- und fos-Gene mithilfe sehr sensitiver und exakter Methoden („real-time“ RT-PCR bzw. ELISA) untersucht.

4.1.1 Analyse der jun- und fos-mRNA-Expression

Bei den Befunden der mRNA-Expressionsanalyse fällt vor allem das in GT-SM-Proben erhöhte und von den anderen Gruppen abweichende Expressionsniveau der jun- und fos-Gene auf. Diese starke Expression aller AP-1 Untereinheiten bei akutem GT lässt sich dabei mit dem Auftreten von Einblutungen in das Gelenk durch die Gelenkverletzung (244) oder dem dabei auftretenden mechanischem Stress erklären (245). Diese Faktoren führen bekanntermaßen zur Induktion der jun- und fos-Gene (246). Wahrscheinlich ist also das Auftreten der in GT deutlich erhöhten jun-/fos-Expression eine Folge der Gelenkverletzung.

Die mRNA-Expression des Proto-Onkogens cjun war allerdings auch in den post mortem NK numerisch erhöht, die die mRNA-Expression in einem normalen, nicht veränderten oder verletzten Gelenk wahrscheinlich am besten repräsentieren. Die Expressionsniveaus der anderen jun- und fos-Gene waren dagegen in post mortem NK, OA-SM und RA-SM vergleichbar. Dies wurde durch Untersuchungen in isolierten SFB und MΦ bestätigt, die in RA- und OA-Proben kaum voneinander abweichende Expressionsniveaus zeigten. Dies deutet darauf hin, daß sich die mRNA-Expression der Proto-Onkogene in verschiedenen rheumatischen Erkrankungen trotz ihrer unterschiedlichen Pathogenese kaum

unterscheidet. Diese Befunde stehen im deutlichen Widerspruch zu einer Reihe von Studien, in denen eine erhöhte jun- und fos-mRNA-Expression in der RA-SM nachgewiesen werden konnte (52;247). Allerdings konnten diese Beobachtungen durch andere Studien, die von gleichen oder sogar leicht reduzierten Expressionsniveaus in der RA-SM berichten, nicht bestätigt werden (40;53;248). Darüber hinaus wurden auch in isolierten OA-SFB vergleichbare cjun- und cfos-mRNA-Expressionsniveaus im Vergleich zu RA-SFB beschrieben (28;249), was ebenfalls die in dieser Arbeit beschriebenen Befunde bestätigt.

Eine mögliche Ursache für die sich widersprechenden Befunde könnte dabei das Auftreten von RA-Subgruppen sein, die sich durch eine erhöhte bzw. eine kaum veränderte Expression bestimmter Proto-Onkogene unterscheiden. Dies wäre im Rahmen der multifaktoriellen Entstehung der RA durchaus vorstellbar (250), da bei einer Gruppe mit geringer Proto-Onkogenexpression andere Faktoren für die Pathogenese im Vordergrund stehen könnten. Denkbar wären dabei u. a. initiale Veränderungen in Tumor-Suppressoren wie p53, da Mutationen in diesem Tumor-Suppressor an der Teil-Entartung der SFB beteiligt sein könnten (251;252). Außerdem könnte eine erhöhte Aktivität von Proteinkinasen in verschiedenen Signaltransduktionskaskaden eine entscheidende Rolle spielen. Beispiele hierfür sind neben der JNK die p38 MAPK oder die ERK (253), die eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CREB (254) bzw. JunB und cFos (73;103;104) auch ohne erhöhten mRNA-Spiegel hervorrufen könnten. Da diese Transkriptionsfaktoren u. a. an der Expression pro-inflammatorischer und pro-destruktiver Proteine beteiligt sind (55;56) könnten auch sie entscheidend für die Aktivierung pro-inflammatorischer und/oder pro-destruktiver Prozesse in der RA sein.

Eine weitere Möglichkeit wäre das Auftreten einer erhöhten jun-/fos-mRNA-Expression vor allem im Anfangsstadium der RA. Dieses erhöhte Expressionsniveau könnte sich dann während des Krankheitsverlaufes auf ein annähernd normales Maß reduzieren und durch eine konstitutive Expression als Folge der permanenten Stimulierung in der RA ersetzt werden (255). Durch die konstitutive mRNA-Expression könnten die jun- und fos-Gene trotz eines normalen Niveaus dauerhaft die Entwicklung der RA beeinflussen. Allerdings weisen die Studien, die über eine erhöhte jun-/fos-mRNA-Expression berichten, keine Patienten mit besonders kurzer Krankheitsdauer aus und auch die in der vorliegenden Arbeit erhobenen hohen individuellen mRNA-Expressionswerte, die z. T. deutlich über der mittleren Expression lagen, konnten nicht ausschließlich den Patienten mit kurzer Erkrankungsdauer zugeordnet werden. Das Auftreten von Patienten-Subgruppen mit unterschiedlichen Expressionsniveaus ist also momentan deutlich wahrscheinlicher als die Zuordnung hoher Expressionswerte zu Patienten mit früher RA.

4.1.2 Analyse der Jun- und Fos-Proteinexpression

Im Gegensatz zu den vergleichsweise niedrigen jun-mRNA-Expressionsniveaus zeigte die RA-SM bei der Untersuchung der Jun-Proteinexpressionsniveaus eine (z. T. sogar signifikante) Erhöhung im Vergleich zu OA-, GT- und post mortem NK-SM. Diese Befunde decken sich mit den in der Literatur allgemein als erhöht beschriebenen Proteinniveaus der Jun-Proto-Onkogene in der RA-SM (35;51). Außerdem konnte in immunhistochemischen Analysen und *in situ* Hybridisierungen die Expression der Jun-/Fos-Proto-Onkoproteine durch Doppelfärbungen mit Fibroblastenmarkern (Kollagen III-mRNA) vor allem den SFB in der Deckzellschicht bzw. an der Knorpel-Pannus-Genze, dem Ort des destruktiven Geschehens, zugeordnet werden (siehe auch 40;51;247). Dies bestätigt die Aktivierung von AP-1 in den aktivierten, aggressiv-destruktiven SFB.

Die in der RA erhöht exprimierten, aktivierenden Proteine cFos und cJun können sich auf verschiedene Weise auf die Pathogenese der RA auswirken. Zunächst einmal kommt es durch die generelle Erhöhung des AP-1-Niveaus zu einer erhöhten Transkription AP-1-abhängiger Gene. Diese äußert sich in der RA vor allem durch die erhöhten Spiegel von MMPs (33) und Zytokinen (23). Darüber hinaus dürften die AP-1-Spiegel auch an der Proliferation der SFBs beteiligt sein (256;257), da AP-1 ein wichtiger Proliferationsaktivator ist (69). Darüber hinaus ist auch eine Stabilisierung der gebildeten AP-1-Komplexe durch eine verstärkte Jun- und Fos-Heterodimerisierung denkbar (60). Die Ursachen dafür könnten im veränderten Jun-/Fos-Expressionsniveau oder im veränderten jun-/fos-Koexpressionsmuster in der RA liegen, das in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird. Diese Verschiebung im Expressionsmuster, die nicht nur die mRNA-Ebene, sondern auch die Proteinebene erfaßt, dürfte einen bedeutsamen Einfluß auf die Zusammensetzung der resultierenden AP-1-Komplexe und damit auf ihre biochemischen Eigenschaften ausüben. Die Komposition der AP-1-Komplexe wirkt sich nicht nur auf ihre Stabilität aus (60), sondern ist auch für ihre Spezifität und Affinität zu den verschiedenen AP-1-Bindungssequenzen verantwortlich (55;107;110). Auf diese Weise könnte das erhöhte cJun-/cFos-Proteinniveau zur Erhöhung der Bindungsaktivität der resultierenden AP-1-Komplexe beitragen, die in der RA tatsächlich nachgewiesen werden konnte (51;70). Da auch in normalen Zellen die zelluläre Aktivität u. a. über die Zusammensetzung des Transkriptionsfaktors AP-1 reguliert wird (108;109), ist eine Beteiligung von modifiziert zusammengesetzten AP-1-Faktoren an Prozessen wie verstärkter Proliferation oder Teilverlust der Differenzierung in den teil-entarteten RA-SFB denkbar. Ein Schwerpunkt zukünftiger Analysen muß deshalb die Klärung der Zusammensetzung der AP-1-Komplexe in der RA-SM und in den RA-SFB sein.

Da bei der Analyse der Proteinexpression aufgrund der Meßmethode (Detektion von AP-1-Komplexen, die an TREs gebunden sind) vor allem die funktionell aktiven Proteine detektiert wurden, müssen auch andere Faktoren berücksichtigt werden, die zur verstärkten Aktivierung von AP-1 beitragen. Dazu gehören u. a. eine erhöhte Transaktivierungsaktivität der gebildeten AP-1-Komplexe durch eine erhöhte post-translationale Phosphorylierung, z. B. durch die Jun N-terminale Kinase 2 (JNK2), die in RA-SM eine höhere Aktivität aufweist als in OA-SM (105;258), oder die Kooperation von AP-1 mit anderen Transkriptionsfaktoren, die zur Modulation der AP-1-Aktivität in den Promotoren AP-1 abhängiger Gene beitragen (111). Der Einfluß dieser Faktoren sowie ihre Interaktion mit den AP-1-Komplexen in der RA-SM und den RA-SFB sollen deshalb ebenfalls in weiteren Studien untersucht werden.

Die signifikante Proteinüberexpression von JunB und JunD in der RA erscheint auf den ersten Blick paradox angesichts ihres eher deaktivierenden Einflusses auf zelluläre Prozesse (61;67;94;118;129;131) und ihres hemmenden Einflusses auf RA-SFB (132). Allerdings muß dabei berücksichtigt werden, daß JunB in Abhängigkeit von Zustand, Umgebung und Art der Zelle auch über aktivierende Funktionen verfügt. Dazu zählen unter anderem die Fähigkeit von JunB, das Protein cJun in cjun-knock-out-Mäusen funktionell zu ersetzen und die unverzichtbare Rolle von JunB in der Embryonalentwicklung (124;125). Obwohl JunD eigentlich über keinerlei transformierende Eigenschaften verfügt, ist es bei verstärkter Homodimer-Bildung ebenfalls in der Lage, in Hühner-Fibroblasten Merkmale von Transformation hervorzurufen. Dazu zählen z. B. das Wachstum in Medium mit verringertem Serumanteil und die Koloniebildung in Agar (259). Darüber hinaus ist die Wirkung von JunD als Proliferationshemmer und Tumor-Suppressor indirekt und vor allem von seiner Bindung zum Tumor-Suppressor Menin abhängig (260;261). Eine Beeinträchtigung der Bindung von JunD zu Menin, z. B. bei einem geringen Menin-Spiegel oder bei einer durch Mutationen inhibierten Protein-Protein-Interaktion, könnte also in einer aktivierenden Wirkung von JunD resultieren. Mutationen im Gen junD, die zu einer Inhibierung der Interaktion mit Menin führen, wurden bereits beschrieben (261).

Weitere Faktoren, die einen modifizierenden Einfluß auf die Funktion von JunB und JunD in der RA-SM haben könnten, sind z. B. eine erhöhte Expression weiterer Transkriptionsfaktoren, wie Egr-1 (53;248) und NFκB (51). Diese Transkriptionsfaktoren sind wie AP-1 an der Expression pro-inflammatorischer und pro-destruktiver Proteine beteiligt. NFκB führt z. B. zur Expression von MMPs (51) und verschiedenen Zytokinen (137); Egr-1 ist u. a. für die Expression von TNF-α und den Transkriptionsfaktoren ATF-2 und junB verantwortlich (142). Eine Kooperation dieser Transkriptionsfaktoren mit den eher

deaktivierenden Proteinen JunB und JunD könnte dann trotzdem zu einer Aktivierung von SFB führen.

An der Kooperation von AP-1 mit Bindungsfaktoren an anderen Bindungsmotiven auf der DNA könnten JunB und JunD ebenfalls beteiligt sein. Dort könnten sie eine verstärkende Wirkung auf die Transkription von Genen ausüben, auch wenn die Bindungsstelle nicht in unmittelbarer Nähe zum Gen liegt. Ein Beispiel für eine solche „upstream“ gelegene regulatorische Sequenz findet sich im Stromelysin-Promotor (60).

Berücksichtigen sollte man auch die Abhängigkeit der funktionellen Effekte des AP-1-Transkriptionsfaktors von seiner spezifischen Zusammensetzung aus Untereinheiten (60). So weist eine der AP-1-bindenden Sequenzen im MMP-1-Promotor eine erhöhte Affinität für die Bindung von AP-1-Faktoren auf, die cFos und JunD enthalten (55). Hier zeigt sich also eine direkte Beteiligung von JunD an der Regulation eines pro-destruktiven Proteins.

Trotzdem steht ein allgemein deaktivierender Einfluß von JunB und JunD gut im Einklang mit der negativen Korrelation zwischen ihrer Proteinexpression und dem inflammatorischen Status der untersuchten RA-Patienten (repräsentiert durch RF- und CRP-Spiegel).

4.1.3 Die Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinexpression

Beim Vergleich der mRNA- und der Proteinexpression der jun- und fos-Gene fällt auf, daß in der RA im Vergleich zu den übrigen Gruppen eine numerisch oder signifikant erhöhte Menge an Jun- und Fos-Proteinen auftritt, obwohl sich die mRNA-Expression dieser Gene in der RA nicht vom Expressionsniveau der NK- oder OA-Proben unterscheidet. Interessanterweise ist die auffällige Diskrepanz zwischen der mRNA- und der Proteinexpression nicht auf die Proto-Onkogene begrenzt. TTP und HuR (nicht jedoch AUF-1) weisen in der RA-SM ebenfalls Diskrepanzen zwischen ihrer mRNA- (geringe Expression im Vergleich zu NK) und ihrer Proteinexpression auf (höhere Expression im Vergleich zu NK). Diese Befunde zeigen, daß einerseits verschiedene Familien bzw. Gruppen von Genen von dieser Entkopplung zwischen den relativen mRNA- und Proteinmengen betroffen sind, daß diese Diskrepanzen aber andererseits nicht alle Proteine erfassen. Weitere, ebenfalls in der AG Experimentelle Rheumatologie erzielte Ergebnisse zeigen auch in der Antigen-induzierten Arthritis der Ratte eine Diskrepanz zwischen den mRNA- und den Proteinniveaus von IL-1 β , IL-6 und TNF- α (262). Diese Befunde weisen auf ein häufigeres Auftreten dieser Phänomene in verschiedenen Arthritiden bezüglich unterschiedlicher Gene hin.

Das Auftreten einer solchen Diskrepanz zwischen der mRNA- und der Proteinexpression von Molekülen, die wahrscheinlich in die Pathogenese der RA involviert

sind, ist äußerst bemerkenswert. Sie erweitert und vertieft die Befunde zu einer vergleichbaren Diskrepanz im Falle des Tumor-Suppressorproteins Maspin (263).

Das Auftreten der Diskrepanz zwischen der mRNA- und der Proteinexpression der jun/fos-Gene ausschließlich in der RA-SM und das deutlich veränderte Korrelationsprofil in der RA im Vergleich zu OA und Kontrollen weisen auf eine bedeutende, z. T. krankheitsspezifische Veränderung der post-transkriptionalen Prozesse in dieser chronischen rheumatischen Erkrankung hin. Die durch die erhöhte Jun- und Fos-Proteinexpression entstehenden AP-1-Komplexe könnten dabei eine für die RA bereits beschriebene erhöhte Bindungsaktivität aufweisen (70) und somit eine veränderte Expression AP-1-abhängiger, krankheitsrelevanter Gene nach sich ziehen. Außerdem könnte die Änderung des relativen Verhältnisses der einzelnen Jun- und Fos-Proteine in einer modifizierten Zusammensetzung der AP-1-Komplexe resultieren, was (in Abhängigkeit vom jeweiligen Promotor) zu einer privilegierten Expression pro-inflammatorischer bzw. pro-destruktiver Gene in der RA führen würde (60).

Die RNA-Qualitätsanalysen schließen dabei eine fälschlich zu niedrig bestimmte mRNA-Expression in einzelnen Proben oder Probenpopulationen aus. Eine Degradation der RNA, beispielsweise nach Kontamination mit RNasen (264) oder infolge eines zu langen Zeitraums zwischen Entnahme und Verarbeitung von post-mortem Proben (265;266), lag in keiner der Proben vor.

Interessanterweise konnten keine Korrelationen zwischen mRNA- und Proteinexpression ermittelt werden, was ebenfalls auf eine Störung zwischen Transkription und Translation hindeutet. Deshalb muß von einer Dysregulation der transkriptionalen und/oder translationalen Prozesse in der RA-SM ausgegangen werden, wie sie auch in verschiedenen Tumoren beobachtet wurde (267).

4.1.4 Der Einfluß mRNA-stabilitätsmodifizierender Proteine auf die Diskrepanz

Einen wichtigen Einfluß auf die Entstehung des Diskrepanz-Phänomens könnten dabei die mRNA-stabilitätsmodifizierenden Proteine haben. Die Proteine AUF-1, TTP und HuR spielen bekanntlich eine wichtige Rolle in der post-transkriptionalen Regulation der mRNA-Halbwertszeit von Proto-Onkogenen und Zytokinen (156;158;162).

HuR und TTP, die nachweislich den ARE-vermittelten Abbau der cfos- und der cjun-mRNA inhibieren bzw. fördern (155;162) und überlappende Bindungsspezifitäten für bestimmte Regionen auf der mRNA zeigen (158), weisen in der RA und (in einem geringeren Maße) auch in der OA eine erhöhte Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrollen auf (NK und GT). Die im Rahmen dieser Arbeit in RA (und OA) nachgewiesene erhöhte TTP-Expression dürfte deshalb zumindest zum Teil für die niedrigen Niveaus von jun- und fos-

mRNA verantwortlich sein, die sowohl in RA-SM als auch in OA-SM beobachtet wurden (177). Während in RA- und OA-SM auch eine erhöhte HuR-Menge nachgewiesen werden konnte, wurde ein erhöhtes Jun- und Fos-Proteinniveau hingegen ausschließlich in RA-SM - nicht jedoch in OA-SM - beobachtet. Diese Daten lassen einen spezifischen, bisher noch nicht beschriebenen Einfluß von HuR auf die Jun-/Fos-Expression in der RA vermuten, der sich mechanistisch von der Wirkung von HuR auf die mRNA-Stabilität in OA und den Kontrollen unterscheidet. Dabei könnte z. B. eine direkte Konkurrenz zwischen TTP und HuR um die sich überlappenden Bindungsstellen auf der mRNA der verschiedenen Proto-Onkogene eine Rolle spielen (149;158). Die Rolle von HuR besteht dabei möglicherweise in einer verstärkten Stabilisierung der verbleibenden jun- und fos-mRNA-Stränge, die in Konkurrenz zum TTP-getriebenen mRNA-Abbau erfolgt und eine längere Translation der Stränge ermöglicht. So könnte HuR maßgeblich an der Progression der RA beteiligt sein. Ein Einfluß einer verlängerten Translationsdauer auf die Pathogenese von Krebserkrankungen infolge einer Dysregulation des ARE-getriebenen mRNA-Abbaus konnte bereits am Beispiel der Cyclo-Oxygenase-2-mRNA nachgewiesen werden. Die aus der verlängerten Translation resultierende Erhöhung der Cyclo-Oxygenase-2-Proteinmenge steht im Verdacht, an einer erhöhten Angiogenese in diesen Tumoren beteiligt zu sein (267). Eine Koordinierung der antagonistischen Effekte von TTP und HuR durch weitere RNA-bindende Proteine muß ebenfalls in Betracht gezogen werden. Ein Kandidat für ein solches Protein ist das „KH-type splicing regulatory protein“, das die Stabilisierung der „inducible nitric oxide“ mRNA in Anwesenheit von TTP und HuR reguliert (268). Insgesamt könnte sich auf diese Weise die Konkurrenz der beiden antagonistisch wirkenden mRNA-stabilitätsmodifizierenden Proteine TTP und HuR in einer erhöhten Proteinmenge in der RA bei gleichzeitig geringen mRNA-Mengen auswirken.

Im Gegensatz zu TTP und HuR scheint das mRNA-stabilisierende Protein AUF-1 auf die in dieser Arbeit beobachtete Diskrepanz zwischen der mRNA- und der Proteinexpression der jun- und fos-Gene keine Auswirkungen zu haben. Es wurde zwar als wichtiger Regulator der mRNA-HWZ von cjun und cfos beschrieben (167), zeigt in der RA aber weder auf der mRNA- noch auf der Proteinebene eine von den Kontrollgruppen abweichende Expression.

4.2 Mutationen/SNPs in den Promotoren der jun- und fos-Gene

Neben einer Verlängerung der Translationsdauer der jun-/fos-mRNA-Stränge durch HuR könnten auch Mutationen oder SNPs im Promotorbereich dieser Gene einen Einfluß auf die geringe mRNA-Expression und die Diskrepanz zur Proteinexpression haben. So können Mutationen bzw. SNPs zu einer Modifizierung von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen

führen, die eine veränderte Bindungsaffinität zu den dort bindenden Transkriptionsfaktoren nach sich zieht. Dabei ist eine Erhöhung der Bindungsaffinität genauso denkbar, wie eine Reduktion der Affinität bis hin zum totalen Funktionsverlust der Bindungsstelle (187;188). Dies würde die Entkopplung der Expression des betroffenen Gens von der Aktivierung durch einen oder sogar mehrere Transkriptionsfaktoren bedeuten, sofern in dem betroffenen Promotor nicht weitere gleichwertige Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen enthalten sind. Ein vergleichbares Phänomen konnte am Beispiel der Mutagenese von CREs im Proenkephalin-Promotor gezeigt werden, da der resultierende Verlust der CREs zu einer Reduktion der CREB-abhängigen Transkription führt (269). Der Verlust eines TREs im cjun- oder eines SP-1-Bindungselementes im junD-Promotor könnte wahrscheinlich ausgeglichen werden, da diese Promotoren über zwei oder mehr Kopien der genannten Bindungsstellen verfügen (91). Ein Verlust der CAAT-Box in den Promotoren von junB und junD bzw. der STAT-Bindungsstelle in den Promotoren von junB oder cfos würde diese Gene allerdings dem regulativen Einfluß der entsprechenden Transkriptionsfaktoren entziehen, da in diesen Promotoren nur jeweils eine Bindungsstelle für die genannten Transkriptionsfaktoren liegt (91). Mutationen könnten – neben der Beeinflussung bereits bestehender Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen – auch zur Neubildung solcher Bindungsstellen führen, sofern die bestehende DNA-Sequenz dann eine Homologie zu der Konsensus-Sequenz einer Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle erlangt (188).

Außerdem können auch Mutationen/SNPs, die keine funktionellen Elemente betreffen, eine veränderte Promotoraktivität nach sich ziehen. Eine Veränderung der Entfernung zwischen den Bindungsstellen (z. B. durch Deletionen oder Insertionen) kann in einer Beeinträchtigung der Protein-Protein-Interaktionen resultieren (270), die z. B. *in vitro* im Promotor des M-Xylen-degradierenden Enzyms im Plasmid TOL belegt wurde (271)

Das Auftreten von Mutationen und SNPs in den Promotoren könnte also über verschiedene Mechanismen zur verringerten Induzierbarkeit der jun- und fos-Proto-Onkogene im Verlauf der RA führen. Der Verlust der Induzierbarkeit könnte dann in einer konstitutiven Expression dieser Gene resultieren, wie sie für cjun und cfos in der RA bekannt ist (255). Diese konstitutive Expression von jun und fos könnte durch eine geringe, dafür aber konstant vorhandene mRNA-Menge zur hohen Proto-Onkoproteinmenge beitragen. Deshalb wurden in dieser Arbeit die Promotoren der jun- und fos-Gene bezüglich des Auftretens von Mutationen und SNPs analysiert und die funktionellen Auswirkungen dieser Mutationen/SNPs auf die Genexpression untersucht.

4.2.1 Art und Häufigkeit der Mutationen/SNPs in den jun- und fos-Promotoren

Im Rahmen dieser Arbeit konnten eine Reihe von bekannten SNPs in den Promotoren der verschiedenen jun- und fos-Gene bestätigt werden. Außerdem gelang es, einige neue, bisher noch nicht beschriebene Mutationen zu charakterisieren. Diese Mutationen/SNPs wurden initial in einer Auswahl von SM-Proben (RA: 10, OA: 10, NK/GT: 5) mit der NIRCA-Methode identifiziert, deren Sensitivität der Mutationsanalyse mittels konventioneller Sequenzierung deutlich überlegen ist (233). Bei positiven Proben wurde das Auftreten der Mutationen und SNPs auch in SFB bestätigt. Der Nachweis der Mutationen und SNPs auch im Blut der betroffenen Patienten zeigte darüber hinaus, daß alle identifizierten Mutationen/SNPs auch in der Keimbahn auftreten. Es handelt sich also nicht um Mutationen, die erst infolge des oxidativen Stresses im entzündeten Gelenk entstanden sind. Somit könnten sie im Rahmen einer genetischen Prädisposition von Bedeutung sein. Mittels Pyrosequencing wurden einige Mutationen/SNPs in den Promotoren von cjun und cfos dann in den bereits untersuchten SM-Proben bestätigt und (neben weiteren, ausgewählten SNPs) in einer größeren Probenzahl analysiert (RA: 27, OA: 31, NK/GT: 9).

Die Ergebnisse der Mutationsanalyse mittels NIRCA zeigen insgesamt, daß nur wenige Patienten SNPs und Mutationen in den Promotoren der jun-Gene enthalten. So konnten im junD-Promotor überhaupt keine Mutationen festgestellt werden; darüber hinaus sind dort auch keine SNPs bekannt. Die neu identifizierte Mutation im junB-Promotor an der Position -484 konnte nur in jeweils 2 RA- und 2 OA-Proben in heterozygoter Form nachgewiesen werden, während in der 5'-UTR des Gens cjun nur in 2 RA-Proben ein SNP an der Position -617/-618 und eine neue Mutation an der Position -823/-824 in lediglich einer OA-Probe identifiziert werden konnte. Bekannte SNPs an den Positionen -1676 und -1710 treten in allen untersuchten Populationen (RA, OA und NK/GT) zwar wesentlich häufiger auf, - sowohl in homozygoter, als auch in heterozygoter Form -, wie das Pyrosequencing von SM-Proben zeigt. Dafür liegen diese Mutationen/SNPs aber weit hinter dem eigentlichen Kern-Promotor. Da funktionell relevante Mutationen häufig (aber nicht immer) den Kern-Promotor betreffen (270), ist ein bedeutender Einfluß dieser SNPs auf die Expression von cjun eher unwahrscheinlich. Auffällig ist aber, daß alle Mutationen/SNPs im cjun- und im junB-Promotor (mit Ausnahme der SNPs an den Positionen cjun -1676 und -1710) nicht in den normalen Kontrollen (NK/GT) auftreten, sondern RA-spezifisch oder zumindest spezifisch für rheumatische Erkrankungen sind. Eine pathogenetische Bedeutung dieser Mutationen/SNPs in Arthritiden ist daher noch nicht auszuschließen.

Im cfos-Promotor konnten zwei SNPs nachgewiesen werden (an den Positionen -60 und -135), wobei deutlich wird, daß diese eng benachbarten SNPs häufig zusammen auftreten. Hier tritt also eine deutliche Kopplung von zwei verschiedenen SNPs auf. Das Auftreten von

SNPs ist im cfos-Promotor allerdings nicht auf die RA- und OA-Proben begrenzt; so weisen alle post mortem NK-Proben und fast alle GT-Proben die SNPs -60 und -135 auf. Ein krankheitsspezifisches Auftreten von Basenveränderungen beschränkt sich also auf die Promotoren von cjun und junB.

Neben der Kopplung nahe beieinander liegender SNPs treten in einer Reihe von RA- und OA-Patienten auch SNPs zusammen auf, die die Promotoren unterschiedlicher jun- und fos-Gene betreffen. Da sie auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, ist eine Kopplung in diesen Fällen sehr unwahrscheinlich, weil diese mit zunehmender Entfernung stark abnimmt (272). So weisen die Proben mit dem SNP cjun -617/-618 häufig auch die SNPs cfos -60 und -135 auf, während die Mutation junB -484 fast ausschließlich zusammen mit den SNPs cfos -60 und -135 auftritt. Selbst wenn diese SNPs und Mutationen nur sehr geringe Auswirkungen auf die Bindungseigenschaften bestimmter Promotorregionen oder die funktionell relevanten Abstände zwischen verschiedenen Sequenzen haben sollten, sind additive Effekte beim gemeinsamen Auftreten verschiedener Mutationen/SNPs denkbar.

4.2.2 Einfluß der identifizierten Mutationen/SNPs auf die Genexpression

Um die mittels NIRCA und Pyrosequencing identifizierten Mutationen und SNPs in den Promotoren der jun- und fos-Gene bezüglich funktioneller Effekte zu untersuchen, wurden die entsprechenden Promotorabschnitte in der wt- oder der mutierten Variante mithilfe eines Luziferase-Reporterassays in NIH-3T3-Zellen analysiert. Die Reporterassays zeigen, daß ohne Stimulierung der Zellen alle wt-Promotorabschnitte (die normalerweise nahe vor dem Translationsstart liegen) nach der Transfektion zu einer deutlichen Expression des Reportergens Firefly-Luziferase führen, während die gleichen Promotorabschnitte in ihrer mutierten Form signifikant geringere Effekte haben. Diese Effekte sind sowohl einen, als auch zwei Tage nach der Transfektion zu beobachten und so gravierend, daß die Reporterexpression in allen Fällen signifikant um ca. 80% reduziert wird (in den meisten Fällen sogar um ca. 90%). Die Auswirkungen dieser Mutationen und SNPs auf die Funktion des entsprechenden Promotors sind also beträchtlich.

Ein sehr ähnliches Bild zeigt sich bei der Betrachtung der Reporterexpression nach Stimulierung mit PMA. Die mutierten Varianten des cjun- und des cfos-Promotors zeigen auch unter Einfluß von PMA eine geringe Expression des Reportergens. Die Reduktion ist dabei meist noch deutlicher als ohne Stimulierung. Nur der junB-Promotor weicht von diesem Verhalten ab. Die mutierte Variante (junB -484) zeigt einen Tag nach der Transfektion unter Stimulierung exakt die gleiche Reporterexpression wie der wt-Promotor. Und auch nach zwei Tagen reduziert sich die Luziferase-Expression nur um ca. 45%, was einen wesentlich geringeren Effekt als ohne Stimulierung oder im Vergleich zu den anderen Promotoren

darstellt. Daraus läßt sich folgern, daß sich die Mutation im junB-Promotor wahrscheinlich hauptsächlich auf die basale Expression dieses Gens auswirkt, während die Expression infolge von Stimulierung deutlich weniger beeinträchtigt wird.

Es ist sehr überraschend, daß der zweite cjun-Promotorabschnitt (-619 bis -1736) keine Expression des Reportergens induziert (nicht einmal in der wt-Variante oder nach Stimulierung mit PMA), da dieser Promotorabschnitt nach Literaturdaten den eigentlichen Kern-Promotor enthält. Der cjun-Promotor I (-1 bis -779), der mit und ohne Stimulierung eine deutliche Reportergenexpression bewirkt, enthält hingegen einen großen Teil der 5'-UTR und sollte ohne den Kern-Promotor eigentlich keine nennenswerte Genexpression hervorrufen. Die Transkriptionsinitiation durch die 5'-UTR von cjun auch in Abwesenheit des Kernpromotors und die mangelnde Transkriptionseffizienz des reinen Kern-Promotors ist äußerst bemerkenswert und konnte meines Wissens im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden. Bisherige Untersuchungen des cjun Promotors erfolgten zumeist mit Reportergenkonstrukten, die neben dem Kern-Promotor von cjun auch immer große Teile der 5'-UTR enthielten (274;275). Die in diesen Studien ermittelte Transkriptionsaktivierung durch den Kern-Promotor steht deshalb nicht im Widerspruch zu den hier vorgelegten Daten, da die vorhandenen Teile der 5'-UTR wahrscheinlich zur Verstärkung der Induktion durch den Kern-Promotor beitrugen. Daß diese Studien nur von einer geringen Expressions-Reduktion bei der Deletion kleinerer Teile der 5'-UTR (entweder am 5'- oder am 3'-Ende) berichten, weist darauf hin, daß die 5'-UTR über mehrere, kooperativ und additiv wirkende Transkriptionsverstärker verfügt. So können die verbleibenden Elemente wahrscheinlich den Verlust eines Teils der Transkriptionsverstärker ausgleichen. Das im cjun-Promotor II-Abschnitt enthaltene 5'-Ende der 5'-UTR (-619 bis -973) scheint allein aber nicht auszureichen, um die Initiation der Transkription durch den Kern-Promotor zu verstärken.

Die Fähigkeit der 5'-UTR von cjun zur Induktion der Transkription eines nachfolgenden Gens dürfte im Auftreten von verschiedenen funktionell relevanten Sequenzabschnitten in der UTR begründet liegen. Bestimmte Sequenzabschnitte weisen nämlich aufgrund ihres hohen AT-Gehaltes und/oder durch die Basenfolge eine gewisse Ähnlichkeit zur TATA-Konsensus-Sequenz (z. B. TAATTA, -205 bis -200) oder zur Konsensus-Sequenz verschiedener Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen wie dem TRE (z. B. TGAGTGA, -274 bis -268) oder der GC-Box (GGGCGG; -406 bis -401) auf (NCBI-Datenbanksequenz NT_032977). Diese ermöglichen wahrscheinlich verschiedenen Transkriptionsfaktoren die Bindung und die Initiation der Transkription auch in Abwesenheit des weiter „upstream“ gelegenen Kern-Promotorabschnitts. *In vivo* sind die in der 5'-UTR lokalisierten Elemente wahrscheinlich an der Verstärkung der Transkriptionsinitiation durch

den Kern-Promotor beteiligt. Eine Lokalisation wichtiger regulativer Elemente in der 5'-UTR von cjun erscheint nach Literaturdaten auch deswegen möglich, weil die jun-Gene einige Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen an ungewöhnlichen Positionen aufweisen. So besitzt cjun selbst einen Östrogen-induzierbaren „Enhancer“ in der codierenden Region (276), während junB über regulatorische Elemente (ein SRE und ein CRE) in der 3'-UTR verfügt (277). Hinzu kommt, daß die funktionell relevanten SNPs -60 und -135 im cfos-Promotor I (mit 5'-UTR und Kern-Promotor) ebenfalls in der 5'-UTR dieses Gens lokalisiert sind. So könnte die 5'-UTR (zumindest für die jun- und fos-Gene) einen größeren Einfluß auf die Genexpression hat als bislang vermutet.

Da die in cjun bekannten SNPs bzw. die identifizierten Mutationen nicht in den bisher bekannten Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren liegen, stellte sich die Frage, ob die Regionen bisher nicht identifizierte Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen oder andere wichtige Funktionselemente enthalten (wie Enhancer, Silencer, o. ä.). Sollten diese Regionen von besonderer Wichtigkeit für die jun- und fos-Gene sein, müßten sie eigentlich auch in anderen Spezies konserviert sein, wie bisherige Analysen in verschiedenen Promotoren nahelegen (278-281). Die Analyse des Konservierungsgrades der jun-Gene und ihrer Promotoren zeigte allerdings, daß die Positionen der Mutationen/SNPs im Gen cjun keinen erhöhten Konservierungsgrad aufweisen. Überraschenderweise wurde aber auch deutlich, daß selbst die bekannten Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen nicht in hochkonservierten Promotorabschnitten lokalisiert sind. Konservierungsanalysen sind also offensichtlich nicht in jedem Fall geeignet, um eine gültige Vorhersage über die Wichtigkeit von DNA-Abschnitten oder -Sequenzen zu treffen. Der festgestellte, geringe Konservierungsgrad der einzelnen Mutationen und SNPs stellt ihre funktionelle Relevanz also nicht unbedingt in Frage. Dies gilt natürlich insbesondere angesichts der in dieser Arbeit gezeigten funktionellen Auswirkungen. Wie die Mutationen und SNPs diese bemerkenswerten funktionellen Effekte hervorrufen, muß in späteren Versuchen geklärt werden. Eine Möglichkeit wäre z. B. der Nachweis von Proteinen, die an diese Sequenzen in der wt- oder der mutierten Variante binden, mittels EMSA. Interessanterweise zeigt die Position -484 im Gen junB, an der erstmals das Auftreten einer Mutation nachgewiesen werden konnte, einen erstaunlich hohen Konservierungsgrad von 100%. Dies deutet darauf hin, daß diese Position einen besonders wichtigen Einfluß auf die Promotorfunktion haben könnte, da die meisten anderen Positionen im Promotor auch bei nachgewiesener funktioneller Relevanz nicht so stark konserviert sind und auch der durchschnittliche Konservierungsgrad des gesamten junB-Gens niedriger liegt als bei anderen jun-Genen.

Da die von den genannten Mutationen/SNPs hervorgerufenen Effekte in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben werden, existieren leider keine vergleichbaren Literaturdaten. Für die *jun*- und *fos*-Gene sind bisher lediglich Studien zur Bedeutung von verschiedenen Abschnitten in ihren Promotoren und von bestimmten Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen bekannt (274;275). Allerdings liegen z. B. für die Gene Melanocortin-3 und MMP-1 Berichte vor, die unterschiedliche Effekte von Mutationen im Promotorbereich auf die Expression der entsprechenden Gene beschreiben. Beim MMP-1-Promotor führt eine solche Mutation z. B. zur Erhöhung der Genexpression (188), während die im Melanocortin-3-Promotor charakterisierte Mutation eine Reduktion der Genexpression nach sich zieht (187).

4.2.3 Bedeutung der Mutationen/SNPs für die Pathogenese der RA

Die Reduktion der Promotoraktivität wurde mittels Transfektion in einer murinen Fibroblasten-Zelllinie (NIH-3T3) untersucht. Dies ist eine gängige Methode und das übliche Vorgehen zur Analyse der Promotoraktivität (274;275). Da es sich aber um ein artifizielles System handelt, das nicht völlig mit der humanen *in vivo*-Situation vergleichbar ist, sind die Befunde möglicherweise nicht vollständig auf humane Zellen in ihrem normalen zellulären und genetischen Kontext übertragbar. Dennoch sind die Effekte so deutlich, daß sie sich mit größter Wahrscheinlichkeit auch in der betroffenen SM und den SFB auswirken. Allerdings dürften die drastischen Effekte dieser Mutationen und SNPs in vielen Patienten und Spendern abgemildert werden, da sie meist in heterozygoter Form vorliegen und das ebenfalls vorkommende wt-Allel der völligen Unterdrückung der *jun*-/*fos*-Genexpression entgegenwirken dürfte. Insgesamt bieten die negativen Auswirkungen dieser Mutationen und SNPs auf die Promotor-Funktion damit eine gute Erklärung für die geringe, aber detektierbare mRNA-Expression in der RA.

4.3 Mutationen in den codierenden Regionen der *jun*- und *fos*-Gene

Mutationen in den codierenden Regionen der *jun*- und *fos*-Gene, die zu AS-Veränderungen in funktionell wichtigen Regionen der resultierenden Proteine führen, könnten eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 spielen. Am deutlichsten wird dies bei Veränderungen, die zum Verlust regulatorischer Proteinabschnitte führen und die sich in einer erhöhten oder konstitutiven Aktivität des betroffenen Protein äußern (282;283). Bei bisherigen Untersuchungen in der codierenden Regionen von *cfos* konnte bereits eine Mutation in einer Transaktivierungsdomäne lokalisiert werden, die zu einer erhöhten Expression von MMP-1 und TIMP-1 in SFB führt (186). Die in dieser Arbeit untersuchten codierenden Regionen von *junB* und *junD* weisen allerdings entweder keine Mutationen auf (wie bei *junD*) oder nur stille, nicht zu einem AS-Austausch führende Mutationen (wie bei

junB). Die Tatsache, daß weder in der Literatur noch in den Datenbanksequenzen Mutationen oder SNPs in der codierenden Region von junD erwähnt werden und auch junB lediglich einen einzelnen bekannten SNP aufweist (beide NCBI-Datenbanksequenz NT_011295), spricht dafür, daß diese beide deaktivierend wirkenden Proteine stark konserviert sind. Eine Beteiligung von Mutationen in den codierenden Regionen von junB und junD an der Erhöhung der AP-1-Aktivität und ein daraus folgender Einfluß auf die Pathogenese der RA erscheint daher unwahrscheinlich.

4.4 Entwicklung eines DNA-Microarrays zur Detektion von Mutationen/SNPs

Auf der Grundlage der in den öffentlichen Datenbanken niedergelegten SNPs und den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Mutationen wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Clontech ein DNA-Microarray zur Detektion von SNPs und Mutationen in den jun- und fos-Genen/Promotoren entwickelt. Dieser sollte zu einem breit einsetzbaren wissenschaftlichen Werkzeug optimiert werden. Langfristig ist sogar eine Weiterentwicklung zu einem (auch kommerziell nutzbaren) diagnostischen Werkzeug geplant, das bei einer klinischen Anwendung Vorhersagen ermöglichen soll (z. B. über die zu erwartende Schwere der Erkrankung bzw. über die Wirksamkeit von bestimmten Therapeutika). Kurzfristig sollte der Microarray aber zunächst genutzt werden, um Daten über die Assoziation von bestimmten Mutationen oder SNPs mit der Suszeptibilität einzelner Individuen für das Auftreten der RA zu erheben. Die dazu notwendigen Optimierungsarbeiten und Tests wurden im Rahmen dieser Dissertation geleistet.

4.4.1 Design des DNA-Microarrays

Zur Analyse von Mutationen/SNPs, die mit rheumatischen Erkrankungen assoziiert sein könnten, wurde zunächst ein Prototyp des DNA-Microarrays entwickelt (RHEUMA_1). Dieser enthielt neben den zu diesem Zeitpunkt identifizierten Mutationen/SNPs noch eine Reihe weiterer SNPs der codierenden Region bzw. der Promotoren der jun- und fos-Gene. Um die Anzahl der Spots auf dem Microarray für die Optimierung und Validierung in Grenzen zu halten, wurden solche SNPs ausgeschlossen, die in den 5'- und 3'-UTRs oder den Introns lokalisiert waren und damit wahrscheinlich keine funktionelle Auswirkungen hätten (272). Ausgeschlossen wurden außerdem die SNPs in den codierenden Regionen, die keine AS-Austausche bewirken und daher ebenfalls keine Auswirkungen auf die Proteinfunktion haben sollten (272). Nachdem für die SNPs in der 5'-UTR von cjun aber eine funktionelle Relevanz nachgewiesen werden konnte, wurden diese SNPs wieder in das Design von späteren Chipgenerationen aufgenommen (RHEUMA_3). Dieser Schritt erfolgte auch im

Hinblick auf die Literaturdaten über das Auftreten regulatorischer Sequenzen außerhalb der Kern-Promotoren in den jun-Genen (276;277).

4.4.2 Optimierung und Validierung des DNA-Microarrays

Die Parametervariationen, die sich für die Optimierung der Hybridisierung und Markierung der einzelnen Fragmente als hilfreich erwiesen, sind von der entsprechenden Mutation/dem entsprechenden SNP und der Sequenzumgebung abhängig. Dazu gehören u. a. die für die verschiedenen Fragmente eingesetzten Hybridisierungspuffer und die Temperatur. Die nötige Verdoppelung der Konzentration an bdUTP bei der Fragmentsynthese resultiert aus dem geringen Anteil an A und T in der Sequenz der jun-Gene (284-286), während die asymmetrische PCR durch die Anreicherung von Einzelsträngen zur besseren Hybridisierung der Fragmente mit den einzelsträngigen Sonden führte (287). Die Verbesserung der Markierung durch den Ersatz des initial genutzten Streptavidin-Gold-Konjugates (mit anschließender Detektion mit Silberlösung) durch eine Kombination aus Streptavidin-HRP und True Blue HRP-Substrat läßt sich auf die hohe Effizienz der HRP zurückführen. Der Ersatz von Milchpulver durch FCS als Blockierungslösung war nötig, da Milchpulver ein zu hohes Hintergrundsignal verursachte. Die Hybridisierungsdauer mußte wahrscheinlich erhöht werden, weil der Unterschied zwischen wt und Mutante meist nur in einer einzelnen Base bestand. Eine Verlängerung der Hybridisierungsdauer bei konstanter Temperatur ermöglichte so wahrscheinlich die Lösung von Fehlpaarungen.

4.4.3 Einsatz des DNA-Microarrays

Anhand von ausgewählten Proben konnte gezeigt werden, daß der Einsatz des DNA-Microarrays für die Analyse von grundsätzlich Blutproben geeignet ist. Die vollständige Übertragung der Versuchsbedingungen, die durch die initialen Optimierungsschritte für die einzelnen Gen- und Promotorabschnitte identifiziert wurden, ist allerdings nicht möglich. Dies liegt wahrscheinlich daran, daß die Optimierung mit DNA-Fragmenten durchgeführt wurde, die aus Plasmiden amplifiziert wurden.

Im Gegensatz dazu traten bei der Amplifikation von Fragmenten aus Blut-DNA und der Hybridisierung dieser Proben auf dem Microarray vermutlich verschiedene Probleme auf. Ein Problem könnte die Kontamination der DNA mit Proteinen sein, die sich inhibierend auf die PCR auswirken. Als PCR-Inhibitoren kommen im Blut vor allem die Proteine IgG, Hämoglobin und Lactoferrin in Frage (288). Tatsächlich weisen viele der aus Blut isolierten DNA-Aliquots ein Verhältnis der OD_{260 nm} zur OD_{280 nm} von unter 1,8 auf, was auf eine leichte Verunreinigung mit Proteinen hindeutet. Allerdings schlägt die Hybridisierung auch bei vielen DNA-Fragmenten fehl, die aus völlig reinen Blutproben amplifiziert wurden, eine

Inhibierung der PCR kann also zumindest nicht der alleinige Grund für die Probleme sein. Außerdem weisen die amplifizierten PCR-Produkte hohe DNA-Konzentrationen auf (zwischen 150 und 200 ng/μl), was ebenfalls gegen die Anwesenheit eines PCR-Inhibitors in relevanten Mengen spricht. Da die Konzentration der aus Blut amplifizierten Fragmente in der Regel nur 25-50% der aus Plasmiden amplifizierten Fragmente beträgt, könnte auch diese geringere Konzentration für eine nicht optimale Hybridisierung verantwortlich sein, da bei einer geringen DNA-Konzentration vermutlich keine Sättigung der Sonden erfolgt. Daß eine Hybridisierung der komplementären Sequenzen nicht mehr nachweisbar ist, wenn eine bestimmte Probenkonzentration unterschritten wird, ist bekannt (289;290). Der erfolgreiche Einsatz des hier genutzten Systems hängt also auch von einer ausreichenden Probenkonzentration ab.

Ein Hauptproblem dürfte jedoch die Abdeckung vieler Mutationen/SNPs mit einem einzelnen DNA-Fragment sein. So konnte im Rahmen dieser Arbeit für das Fragment der codierenden Region von *cjun* beobachtet werden, daß die Position *cjun* +211 nicht unter den gleichen Bedingungen zu detektieren war wie die anderen Positionen im *cjun*-Gen. Mit dem Fragment *cjun*-Promotor I, das die Position +211 enthält, konnte diese Position unter anderen Bedingungen hingegen nachgewiesen werden. Außerdem erhöht sich bei sehr großen Fragmenten (wie z. B. dem Fragment für die codierende Region von *cfos*) die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen aufgrund zufälliger Sequenzähnlichkeiten. Durch die Verkleinerung der Fragmente sollte aber die Ausbildung unspezifischer Bindungen reduziert werden und damit eine Optimierung der Fragmente möglich sein.

Die Probleme bei der Hybridisierung sollen nun durch weitere Optimierungsschritte gelöst werden. Dazu sollen die Versuchsbedingungen durch Variation des Hybridisierungspuffers, der Hybridisierungstemperatur und der Konzentration des Streptavidin-HRP-Konjugase angepaßt werden. Außerdem soll die Größe der eingesetzten Fragmente reduziert werden, um unspezifische Kreuzreaktionen mit anderen DNA-Sonden zu reduzieren. Darüber hinaus ist geplant, die Fragmentkonzentration zu erhöhen. Dazu soll mit den DNA-Proben zunächst eine konventionelle PCR zur exponentiellen Amplifikation der Produkte durchgeführt werden, bevor der gewünschte Einzelstrang durch eine asymmetrische PCR angereichert wird. Durch diese zusätzlichen Optimierungsversuche verzögert sich zwar der Beginn der Analyse von Assoziationen in einer größeren Patientenzahl. Da der DNA-Microarray den alternativen Methoden [konventionelle Sequenzierung, denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE), etc.] aufgrund der gleichzeitigen Abdeckung vieler Mutationen/SNPs sowie der zu erwartenden Sensitivität aber deutlich überlegen ist, scheint der Aufwand zusätzlicher Optimierungsschritte angesichts des zu erwartenden Nutzens

gerechtfertigt. Außerdem können initiale Assoziationsuntersuchungen schon mit alternativen Techniken (z. B. dem Pyrosequencing) begonnen werden. Für eine Fortsetzung der Entwicklung und Optimierung dieses DNA-Microarrays spricht neben den vielversprechenden bisherigen Ergebnissen auch die breite Anwendung von DNA-Microarrays bei der Identifikation von Polymorphismen (z. B. 291-293). Die Anwendung von Microarrays zur Detektion von Einzelbasenaustauschen ist also weit verbreitet, bedarf allerdings einer sorgfältigen Optimierung.

Die Ergebnisse der Microarray-basierten Analyse der Mutationen/SNPs (-526, -174, -32, +706, +750, +890) zeigen, daß die in der vorliegenden Probenpopulation detektierten Allelfrequenzen die Literaturwerte deutlich überschreiten (NCBI-SNP-Datenbank). Eine mögliche Erklärung ist, daß die untersuchten Proben in ihrer Allelverteilung stark von den Proben anderer Kollektive abweichen. Aufgrund der hohen Zahl an untersuchten Individuen ist dies aber eher unwahrscheinlich. Es ist daher eher zu vermuten, daß die Angaben in den Datenbanken zu niedrig angesetzt sind und durch weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Individuen korrigiert werden müssen.

Der SNP cjun -32 ist von den in dieser Arbeit analysierten Mutationen/SNPs wohl am interessantesten. Dieser SNP, der nur in einer Frequenz von 0,02 auftreten soll, ist in der RA nicht nachweisbar, tritt dafür aber in OA- und NK-Proben mit einer sehr hohen Frequenz von 0,5 bzw. 0,43 auf. Dies könnte auf einen protektiven Effekt dieses SNPs hindeuten. Daher soll das Auftreten dieses SNPs in weiteren Analysen gründlich überprüft werden. Da die anderen Mutationen/SNPs nur geringe Unterschiede zwischen den Gruppen zeigen, können für sie ohne weitere Untersuchungen keine Aussagen über ihre Bedeutung für die RA getroffen werden.

4.5 Bedeutung der Ergebnisse für die Planung von Assoziationsstudien

Die Ergebnisse, die bei der Auswertung von jeweils drei detektierbaren Mutationen/SNPs in der codierenden Region und dem Promotor-Abschnitt I von cjun mit dem Microarray erzielt wurden, deuten darauf hin, daß sich die Allelfrequenzen zwischen den verschiedenen Gruppen in der Regel lediglich um einen Wert von 0,1 unterscheiden dürften. Dies wurde durch das Pyrosequencing von weiteren SNPs (cfos -60, -135; cjun -1676, -1710) bestätigt. Aufgrund dieser zu erwartenden geringen Unterschiede in den Allelfrequenzen müssen in zukünftigen Assoziationsstudien bis zu 500 Patienten pro Gruppe untersucht werden, um tatsächlich existierende Frequenzunterschiede valide zu detektieren und einen falsch positiven oder falsch negativen Nachweis der Assoziation einer Mutation/eines SNPs mit einer rheumatischen Erkrankung zu vermeiden (242). Zur Vorbereitung von Assoziationsstudien,

die zeitnah zum Abschluß dieser Arbeit beginnen sollen, wird deshalb die Sammlung entsprechender Patienten- und Kontrollproben vorangetrieben. Bisher konnten ca. 200 Proben pro Gruppe gesammelt werden. Dieser Pool wird momentan in Zusammenarbeit mit dem Institut für Transfusionsmedizin, der Abteilung Rheumatologie & Osteologie der Klinik für Innere Medizin III und der Orthopädischen Klinik „Rudolf Elle“ weiter ausgebaut.

Für das methodische Vorgehen bei zukünftigen Mutationsanalysen und Assoziationsstudien lassen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erfahrungen mehrere Schlüsse zu. Da Methoden wie das Pyrosequencing oder DNA-Microarrays nur bereits bekannte Mutationen/SNPs detektieren können, müssen hochsensitive Techniken eingesetzt werden, um auch unbekannte Mutationen detektieren zu können. Dafür ist der NIRCA wahrscheinlich am besten geeignet, da er alternativen Methoden (wie der DGGE oder der konventionelle Sequenzierung) in puncto Sensitivität deutlich überlegen ist (233). Nach der initialen Identifizierung von neuen bzw. bekannten Mutationen und SNPs in einer Auswahl an Proben sollte sich dann die Überprüfung einer großen Probenzahl mit einem Hochdurchsatz-Verfahren anschließen. Dafür kommt z. B. das zuverlässige und etablierte Pyrosequencing in Frage. Da dieses aber nur eine Basenveränderung pro Ansatz detektieren kann, ist die Entwicklung eines DNA-Microarrays zur Abdeckung vieler Mutationen/SNPs pro Ansatz (trotz des initialen Aufwandes zur Optimierung) eine vernünftige Alternative.

4.6 Schlußfolgerungen und Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen zeigen, daß die jun- und fos-mRNA in der RA nur in geringen, den normalen Kontrollen entsprechenden Mengen exprimiert wird. Dagegen liegen die Jun- und Fos-Proteine in der RA in deutlich (und z. T. signifikant) erhöhten Konzentrationen vor. Diese Diskrepanz zwischen der mRNA- und Proteinexpression ist bemerkenswert und in der RA bisher nur für den Tumorsuppressor Maspin beschrieben. Eine Ursache für die Diskrepanz könnte die differentielle Expression mRNA-stabilitätsmodifizierender Proteine sein. Während das mRNA-destabilisierende Protein TTP in der RA leicht erhöht exprimiert wird, sind stark erhöhte Protein-Niveaus des mRNA-stabilisierenden Proteins HuR nachweisbar. Deshalb ist es wahrscheinlich, daß TTP zur Degradation eines Teils der exprimierten mRNA-Stränge beiträgt, während HuR die verbleibenden Stränge stabilisiert und ihre Translationsdauer verlängert. Der Befund, daß die mRNA-stabilitätsmodifizierenden Proteine selbst ebenfalls eine Diskrepanz zwischen ihrer mRNA- und Proteinexpression aufweisen, deutet auf eine bisher nicht beschriebene, tiefgreifende Störung der Kopplung von Transkription und Translation in der RA hin.

Darüber hinaus konnten in dieser Arbeit eine Reihe von Keimbahn-Mutationen/SNPs in den Promotoren von cjun, junB und cfos identifiziert werden, die eine

basale Transkription der nachgeschalteten Gene um 80 bis 90% reduzieren. Diese Ergebnisse konnten auch unter Stimulierung bestätigt werden. Die funktionell relevanten Promotor-Mutationen/SNPs tragen also möglicherweise ebenfalls zu einer geringen mRNA-Expression der jun- und fos-Gene bei. Die angesichts der niedrigen mRNA-Expression überraschend hohe Proteinexpression läßt sich dabei mit einer für die RA bereits beschriebenen Umstellung der Expression der jun-/fos-Gene von einer regulierten zu einer konstitutiven Expression erklären. Diese konstitutive Expression könnte durch eine geringe, aber konstant vorhandene mRNA-Menge zur erhöhten Jun-/Fos-Proteinexpression beitragen.

Überraschenderweise zeigte sich bei den Analysen, daß die meisten der funktionell aktiven Mutationen/SNPs in der 5'-UTR lokalisiert sind. Außerdem konnte für cjun gezeigt werden, daß der in der Literatur beschriebene Kern-Promotor in Abwesenheit großer Teile der 5'-UTR nicht zur Initiation der Transkription in der Lage ist. Dies deutet darauf hin, daß die 5'-UTR bei der Expression der jun- und fos-Gene von größerer Bedeutung ist, als bisher angenommen wird.

Um zu überprüfen, ob einige der Mutationen/SNPs mit der Suszeptibilität für die RA assoziiert sind, sind entsprechende Studien geplant. Dazu wurde ein DNA-Microarray entwickelt und optimiert, der die Analyse dieser Basenveränderungen im Hochdurchsatzverfahren erlaubt. Mit diesem innovativen Werkzeug konnten bereits insgesamt 6 Mutationen/SNPs in einer Gesamtzahl von 25 Patienten/Spendern erfolgreich analysiert werden. Aufgrund verbleibender technischer Probleme bei einigen Mutationen, die momentan durch weitere Optimierungsschritte beseitigt werden, war jedoch noch keine komplette Analyse aller Patientenproben möglich. Die bisherigen Ergebnisse zeigen allerdings, daß die Unterschiede zwischen den Allelfrequenzen der Mutationen/SNPs in den verschiedenen Gruppen sehr gering sind und deshalb bis zu 500 Patienten pro Gruppe untersucht werden müssen, um statistisch valide Ergebnisse zu erreichen. Darüber hinaus sind noch weitere Versuche geplant, die die Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinexpression sowie die Zusammensetzung bzw. Bindungsspezifität der AP-1-Komplexe in der RA-SM näher beleuchten sollen. Dazu soll die mRNA- und Proteinexpression weiterer Gene in der RA untersucht werden. Außerdem sollen die von AP-1 in der RA bevorzugt gebundenen DNA-Sequenzen durch Chromatin-Immunpräzipitation bzw. die Zusammensetzung der AP-1-Komplexe mittels EMSA- und Supershift-Experimenten analysiert werden. Die Ergebnisse sollen dazu dienen, offene Fragen nach der Zusammensetzung der AP-1-Komplexe in der RA-SM und nach deren Spezifität für bestimmte Bindungssequenzen zu klären und damit die Erkenntnisse über den Einfluß von AP-1 in der RA zu vertiefen.

Literaturverzeichnis

- (1) Distler O, Muller-Ladner U, Scholmerich J, Gay RE, Gay S. Rheumatoid arthritis: new molecular and cellular aspects. *Med Klin* 1999; 94(12):673-680.
- (2) Rau R. Basistherapie der rheumatoiden Arthritis. 1. Auflage. UNI-MED SCIENCE, Bremen; 2000.
- (3) Dedhia HV, DiBartolomeo A. Rheumatoid arthritis. *Crit Care Clin* 2002; 18(4):841-54, ix.
- (4) Wordsworth P. Rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol* 1992; 4(6):766-769.
- (5) Henderson B, Pettipher ER. The synovial lining cell: biology and pathobiology. *Semin Arthritis Rheum* 1985; 15(1):1-32.
- (6) Zvaifler NJ, Firestein GS. Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37(6):783-789.
- (7) Harris ED. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990; 322(18):1277-1289.
- (8) Bang H, Mollenhauer J, Schulmeister A, Nager C, van Eden W, Wand-Wurttenberger A et al. Isolation and characterization of a cartilage-specific membrane antigen (CH65): comparison with cytokeratins and heat-shock proteins. *Immunology* 1994; 81(2):322-329.
- (9) Dermott JM, Gooya JM, Asefa B, Weiler SR, Smith M, Keller JR. Inhibition of growth by p205: a nuclear protein and putative tumor suppressor expressed during myeloid cell differentiation. *Stem Cells* 2004; 22(5):832-848.
- (10) Hain NA, Stuhlmüller B, Hahn GR, Kalden JR, Deutzmann R, Burmester GR. Biochemical characterization and microsequencing of a 205-kDa synovial protein stimulatory for T cells and reactive with rheumatoid factor containing sera. *J Immunol* 1996; 157(4):1773-1780.
- (11) Blass S, Schumann F, Hain NA, Engel JM, Stuhlmüller B, Burmester GR. p205 is a major target of autoreactive T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42(5):971-980.
- (12) Kinne RW, Brauer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000; 2(3):189-202.
- (13) Handley HH, Yu J, Yu DT, Singh B, Gupta RS, Vaughan JH. Autoantibodies to human heat shock protein (hsp)60 may be induced by *Escherichia coli* groEL. *Clin Exp Immunol* 1996; 103(3):429-435.

- (14) Albani S, Keystone EC, Nelson JL, Ollier WE, La Cava A, Montemayor AC et al. Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1995; 1(5):448-452.
- (15) Roudier J, Rhodes G, Petersen J, Vaughan JH, Carson DA. The Epstein-Barr virus glycoprotein gp110, a molecular link between HLA DR4, HLA DR1, and rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 1988; 27(4):367-371.
- (16) Albani S, Carson DA. A multistep molecular mimicry hypothesis for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunol Today* 1996; 17(10):466-470.
- (17) Takei M, Mitamura K, Fujiwara S, Horie T, Ryu J, Osaka S et al. Detection of Epstein-Barr virus-encoded small RNA 1 and latent membrane protein 1 in synovial lining cells from rheumatoid arthritis patients. *Int Immunol* 1997; 9(5):739-743.
- (18) Koide J, Takada K, Sugiura M, Sekine H, Ito T, Saito K et al. Spontaneous establishment of an Epstein-Barr virus-infected fibroblast line from the synovial tissue of a rheumatoid arthritis patient. *J Virol* 1997; 71(3):2478-2481.
- (19) Janeway C, Travers P, Walport M, Slomchik M. *Immunologie*. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg; 2002.
- (20) Martinez A, Fernandez-Arquero M, Pascual-Salcedo D, Conejero L, Alves H, Balsa A et al. Primary association of tumor necrosis factor-region genetic markers with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(6):1366-1370.
- (21) Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 1994; 15(6):707-724.
- (22) Cutolo M, Sulli A, Barone A, Seriola B, Accardo S. Sex hormones, proto-oncogene expression and apoptosis: their effects on rheumatoid synovial tissue. *Clin Exp Rheumatol* 1996; 14(1):87-94.
- (23) Firestein GS. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 1996; 39(11):1781-1790.
- (24) Alsalameh S, Winter K, Al Ward R, Wendler J, Kalden JR, Kinne RW. Distribution of TNF-alpha, TNF-R55 and TNF-R75 in the rheumatoid synovial membrane: TNF receptors are localized preferentially in the lining layer; TNF-alpha is distributed mainly in the vicinity of TNF receptors in the deeper layers. *Scand J Immunol* 1999; 49(3):278-285.
- (25) Stuhlmuller B, Kunisch E, Franz J, Martinez-Gamboa L, Hernandez MM, Pruss A et al. Detection of oncofetal h19 RNA in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Am J Pathol* 2003; 163(3):901-911.
- (26) Sweeney SE, Firestein GS. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(3):372-378.
- (27) Sack U, Kinne RW, Marx T, Heppt P, Bender S, Emmrich F. Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1993; 13(2):45-51.

- (28) Zimmermann T, Kunisch E, Pfeiffer R, Hirth A, Stahl HD, Sack U et al. Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture - primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. *Arthritis Res* 2001; 3(1):72-76.
- (29) Kinne RW, Palombo-Kinne E, Emmrich F. Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995; 54(6):501-504.
- (30) Nagashima M, Yoshino S, Ishiwata T, Asano G. Role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995; 22(9):1624-1630.
- (31) Oppenheimer-Marks N, Brezinschek RI, Mohamadzadeh M, Vita R, Lipsky PE. Interleukin 15 is produced by endothelial cells and increases the transendothelial migration of T cells In vitro and in the SCID mouse-human rheumatoid arthritis model in vivo. *J Clin Invest* 1998; 101(6):1261-1272.
- (32) Keyszer GM, Heer AH, Gay S. Cytokines and oncogenes in cellular interactions of rheumatoid arthritis. *Stem Cells* 1994; 12(1):75-86.
- (33) Dorr S, Lechtenbohrer N, Rau R, Herborn G, Wagner U, Muller-Myhsok B et al. Association of a specific haplotype across the genes MMP1 and MMP3 with radiographic joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004; 6(3):R199-R207.
- (34) Cunnane G, Fitzgerald O, Beeton C, Cawston TE, Bresnihan B. Early joint erosions and serum levels of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44(10):2263-2274.
- (35) Kinne RW, Boehm S, Iftner T, Aigner T, Vornehm S, Weseloh G et al. Synovial fibroblast-like cells strongly express jun-B and C-fos proto-oncogenes in rheumatoid- and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol Suppl* 1995; 101:121-125.
- (36) Fassbender HG, Simmling-Annefeld M. The potential aggressiveness of synovial tissue in rheumatoid arthritis. *J Pathol* 1983; 139(3):399-406.
- (37) Johansson B, Heim S, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F. Trisomy 7 in non-neoplastic cells. *Genes Chromosomes Cancer* 1993; 6(4):199-205.
- (38) Mertens F, Orndal C, Mandahl N, Heim S, Bauer HF, Rydholm A et al. Chromosome aberrations in tenosynovial giant cell tumors and nontumorous synovial tissue. *Genes Chromosomes Cancer* 1993; 6(4):212-217.
- (39) Kinne RW, Liehr T, Beensen V, Kunisch E, Zimmermann T, Holland H et al. Mosaic chromosomal aberrations in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and other inflammatory joint diseases. *Arthritis Res* 2001; 3(5):319-330.
- (40) Huber R, Kunisch E, Gluck B, Egerer R, Sickinger S, Kinne RW. Comparison of conventional and real-time RT-PCR for the quantitation of jun protooncogene mRNA and analysis of junB mRNA expression in synovial membranes and isolated synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients. *Z Rheumatol* 2003; 62(4):378-389.

- (41) Trabandt A, Aicher WK, Gay RE, Sukhatme VP, Fassbender HG, Gay S. Spontaneous expression of immediately-early response genes c-fos and egr-1 in collagenase-producing rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatol Int* 1992; 12(2):53-59.
- (42) Sano H, Forough R, Maier JA, Case JP, Jackson A, Engleka K et al. Detection of high levels of heparin binding growth factor-1 (acidic fibroblast growth factor) in inflammatory arthritic joints. *J Cell Biol* 1990; 110(4):1417-1426.
- (43) Sack U, Kuhn H, Ermann J, Kinne RW, Vogt S, Jungmichel D et al. Synovial tissue implants from patients with rheumatoid arthritis cause cartilage destruction in knee joints of SCID.bg mice. *J Rheumatol* 1994; 21(1):10-16.
- (44) Muller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE et al. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* 1996; 149(5):1607-1615.
- (45) Lafyatis R, Remmers EF, Roberts AB, Yocum DE, Sporn MB, Wilder RL. Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids. *J Clin Invest* 1989; 83(4):1267-1276.
- (46) Han Z, Boyle DL, Shi Y, Green DR, Firestein GS. Dominant-negative p53 mutations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42(6):1088-1092.
- (47) Kunisch E, Pohlers D, Dunger S, Huber R, Kreusch A, Wiederanders B et al. What can experimental research offer to rheumatology today - the viewpoint of molecular biology? Contribution of molecular biology to pathogenesis research in rheumatology using the example of rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 2002; 61 Suppl 2:II1-II5.
- (48) Firestein GS, Echeverri F, Yeo M, Zvaifler NJ, Green DR. Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(20):10895-10900.
- (49) Roivainen A, Jalava J, Pirila L, Yli-Jama T, Tiusanen H, Toivanen P. H-ras oncogene point mutations in arthritic synovium. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9):1636-1643.
- (50) Xue C, Takahashi M, Hasunuma T, Aono H, Yamamoto K, Yoshino S et al. Characterisation of fibroblast-like cells in pannus lesions of patients with rheumatoid arthritis sharing properties of fibroblasts and chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 1997; 56(4):262-267.
- (51) Han Z, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS. AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* 1998; 28(4):197-208.
- (52) Han Z, Boyle DL, Aupperle KR, Bennett B, Manning AM, Firestein GS. Jun N-terminal kinase in rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291(1):124-130.

- (53) Aicher WK, Dinkel A, Grimbacher B, Haas C, Seydlitz-Kurzbach EV, Peter HH et al. Serum response elements activate and cAMP responsive elements inhibit expression of transcription factor Egr-1 in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients. *Int Immunol* 1999; 11(1):47-61.
- (54) Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072(2-3):129-157.
- (55) White LA, Brinckerhoff CE. Two activator protein-1 elements in the matrix metalloproteinase-1 promoter have different effects on transcription and bind Jun D, c-Fos, and Fra-2. *Matrix Biol* 1995; 14(9):715-725.
- (56) Newberry EP, Willis D, Latifi T, Boudreaux JM, Towler DA. Fibroblast growth factor receptor signaling activates the human interstitial collagenase promoter via the bipartite Ets-AP1 element. *Mol Endocrinol* 1997; 11(8):1129-1144.
- (57) Herder Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 1995.
- (58) Chida K, Nagamori S, Kuroki T. Nuclear translocation of Fos is stimulated by interaction with Jun through the leucine zipper. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55(2):297-302.
- (59) Abate C, Luk D, Curran T. Transcriptional regulation by Fos and Jun in vitro: interaction among multiple activator and regulatory domains. *Mol Cell Biol* 1991; 11(7):3624-3632.
- (60) Ryseck RP, Bravo R. c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* 1991; 6(4):533-542.
- (61) Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001; 20(19):2390-2400.
- (62) Li R, Pei H, Watson DK. Regulation of Ets function by protein - protein interactions. *Oncogene* 2000; 19(55):6514-6523.
- (63) Lively TN, Nguyen TN, Galasinski SK, Goodrich JA. The basic leucine zipper domain of c-Jun functions in transcriptional activation through interaction with the N terminus of human TATA-binding protein-associated factor-1 (human TAF(II)250). *J Biol Chem* 2004; 279(25):26257-26265.
- (64) Lively TN, Ferguson HA, Galasinski SK, Seto AG, Goodrich JA. c-Jun binds the N terminus of human TAF(II)250 to derepress RNA polymerase II transcription in vitro. *J Biol Chem* 2001; 276(27):25582-25588.
- (65) Leonard DA, Rajaram N, Kerppola TK. Structural basis of DNA bending and oriented heterodimer binding by the basic leucine zipper domains of Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(10):4913-4918.
- (66) Rajaram N, Kerppola TK. DNA bending by Fos-Jun and the orientation of heterodimer binding depend on the sequence of the AP-1 site. *EMBO J* 1997; 16(10):2917-2925.

- (67) Castellazzi M, Spyrou G, La Vista N, Dangy JP, Piu F, Yaniv M et al. Overexpression of c-jun, junB, or junD affects cell growth differently. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(20):8890-8894.
- (68) Reddy SP, Mossman BT. Role and regulation of activator protein-1 in toxicant-induced responses of the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283(6):L1161-L1178.
- (69) Kovary K, Bravo R. Expression of different Jun and Fos proteins during the G0-to-G1 transition in mouse fibroblasts: in vitro and in vivo associations. *Mol Cell Biol* 1991; 11(5):2451-2459.
- (70) Asahara H, Fujisawa K, Kobata T, Hasunuma T, Maeda T, Asanuma M et al. Direct evidence of high DNA binding activity of transcription factor AP-1 in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 1997; 40(5):912-918.
- (71) Murata M, Miura Y, Hashiramoto A, Kitamura H, Kawasaki H, Shiozawa K et al. Heat shock protein 90 is required for increased DNA binding activity of activator protein-1, a heterodimer of Fos/JunD, in rheumatoid synovial cells under inflammatory stimuli. *Int J Mol Med* 2005; 15(4):649-653.
- (72) Hodge C, Liao J, Stofega M, Guan K, Carter-Su C, Schwartz J. Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1, and junB through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Biol Chem* 1998; 273(47):31327-31336.
- (73) Taylor LK, Marshak DR, Landreth GE. Identification of a nerve growth factor- and epidermal growth factor-regulated protein kinase that phosphorylates the protooncogene product c-Fos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(2):368-372.
- (74) Kerr LD, Magun BE, Matrisian LM. The role of C-Fos in growth factor regulation of stromelysin/transin gene expression. *Matrix Suppl* 1992; 1:176-183.
- (75) Granet C, Miossec P. Combination of the pro-inflammatory cytokines IL-1, TNF- α and IL-17 leads to enhanced expression and additional recruitment of AP-1 family members, Egr-1 and NF-kappaB in osteoblast-like cells. *Cytokine* 2004; 26(4):169-177.
- (76) Granet C, Maslinski W, Miossec P. Increased AP-1 and NF-kappaB activation and recruitment with the combination of the proinflammatory cytokines IL-1 β , tumor necrosis factor α and IL-17 in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Res Ther* 2004; 6(3):R190-R198.
- (77) Firestein GS, Manning AM. Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 1999; 42(4):609-621.
- (78) Sherman ML, Datta R, Hallahan DE, Weichselbaum RR, Kufe DW. Ionizing radiation regulates expression of the c-jun protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(15):5663-5666.
- (79) Blattner C, Kannouche P, Litfin M, Bender K, Rahmsdorf HJ, Angulo JF et al. UV-Induced stabilization of c-fos and other short-lived mRNAs. *Mol Cell Biol* 2000; 20(10):3616-3625.

- (80) Bukh A, Martinez-Valdez H, Freedman SJ, Freedman MH, Cohen A. The expression of c-fos, c-jun, and c-myc genes is regulated by heat shock in human lymphoid cells. *J Immunol* 1990; 144(12):4835-4840.
- (81) Ikeda S, Yoshida A, Matayoshi S, Tanaka N. Repetitive stretch induces c-fos and myogenin mRNA within several hours in skeletal muscle removed from rats. *Arch Phys Med Rehabil* 2003; 84(3):419-423.
- (82) Jorgensen C, Bressot N, Bologna C, Sany J. Dysregulation of the hypothalamo-pituitary axis in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995; 22(10):1829-1833.
- (83) Passegue E, Richard JL, Boulla G, Gourdji D. Multiple intracellular signalling are involved in thyrotropin-releasing hormone (TRH)-induced c-fos and jun B mRNA levels in clonal prolactin cells. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 107(1):29-40.
- (84) McCubrey JA, Steelman LS, McKearn JP. Interleukin-3 and phorbol esters induce different patterns of immediate-early gene expression in an interleukin-3 dependent cell line. *Oncogene Res* 1991; 6(1):1-12.
- (85) Tsurumi C, Ishida N, Tamura T, Kakizuka A, Nishida E, Okumura E et al. Degradation of c-Fos by the 26S proteasome is accelerated by c-Jun and multiple protein kinases. *Mol Cell Biol* 1995; 15(10):5682-5687.
- (86) Hirai SI, Ryseck RP, Mechta F, Bravo R, Yaniv M. Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family. *EMBO J* 1989; 8(5):1433-1439.
- (87) Chen CY, Chen TM, Shyu AB. Interplay of two functionally and structurally distinct domains of the c-fos AU-rich element specifies its mRNA-destabilizing function. *Mol Cell Biol* 1994; 14(1):416-426.
- (88) Peng SS, Chen CY, Shyu AB. Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c-jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements. *Mol Cell Biol* 1996; 16(4):1490-1499.
- (89) Lamph WW, Wamsley P, Sassone-Corsi P, Verma IM. Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature* 1988; 334(6183):629-631.
- (90) Musti AM, Treier M, Peverali FA, Bohmann D. Differential regulation of c-Jun and JunD by ubiquitin-dependent protein degradation. *Biol Chem* 1996; 377(10):619-624.
- (91) Mechta-Grigoriou F, Gerald D, Yaniv M. The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. *Oncogene* 2001; 20(19):2378-2389.
- (92) Berger I, Shaul Y. c-Fos antagonizes the junD gene positive autoregulatory loop; a novel c-Fos role in promoter switching. *Gene* 1998; 211(2):375-382.
- (93) Berger I, Shaul Y. The human junD gene is positively and selectively autoregulated. *DNA Cell Biol* 1994; 13(3):249-255.
- (94) Schutte J, Viallet J, Nau M, Segal S, Fedorko J, Minna J. jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell* 1989; 59(6):987-997.

- (95) Shimizu K, Kawasaki H, Morisawa T, Nakamura M, Yamamoto E, Yoshikawa N et al. Spontaneous and cytokine regulated c-fos gene expression in rheumatoid synovial cells: resistance to cytokine stimulation when the c-fos gene is overexpressed. *Ann Rheum Dis* 2000; 59(8):636-640.
- (96) Boutillier AL, Barthel F, Roberts JL, Loeffler JP. Beta-adrenergic stimulation of cFOS via protein kinase A is mediated by cAMP regulatory element binding protein (CREB)-dependent and tissue-specific CREB-independent mechanisms in corticotrope cells. *J Biol Chem* 1992; 267(33):23520-23526.
- (97) Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994; 76(6):1025-1037.
- (98) Mendelson KG, Contois LR, Tevosian SG, Davis RJ, Paulson KE. Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(23):12908-12913.
- (99) Ventura JJ, Kennedy NJ, Lamb JA, Flavell RA, Davis RJ. c-Jun NH(2)-terminal kinase is essential for the regulation of AP-1 by tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 2003; 23(8):2871-2882.
- (100) Dai T, Rubie E, Franklin CC, Kraft A, Gillespie DA, Avruch J et al. Stress-activated protein kinases bind directly to the delta domain of c-Jun in resting cells: implications for repression of c-Jun function. *Oncogene* 1995; 10(5):849-855.
- (101) Kallunki T, Deng T, Hibi M, Karin M. c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* 1996; 87(5):929-939.
- (102) May GH, Allen KE, Clark W, Funk M, Gillespie DA. Analysis of the interaction between c-Jun and c-Jun N-terminal kinase in vivo. *J Biol Chem* 1998; 273(50):33429-33435.
- (103) Watanabe M, Sasaki M, Itoh K, Higashihara M, Umezawa K, Kadin ME et al. JunB induced by constitutive CD30-extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase signaling activates the CD30 promoter in anaplastic large cell lymphoma and reed-sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res* 2005; 65(17):7628-7634.
- (104) Frodin M, Gammeltoft S. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 151(1-2):65-77.
- (105) Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L et al. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001; 108(1):73-81.
- (106) Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P et al. Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(11):2501-2512.

- (107) Bakiri L, Matsuo K, Wisniewska M, Wagner EF, Yaniv M. Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers. *Mol Cell Biol* 2002; 22(13):4952-4964.
- (108) Wang H, Xie Z, Scott RE. Differentiation modulates the balance of positive and negative Jun/AP-1 DNA binding activities to regulate cellular proliferative potential: different effects in nontransformed and transformed cells. *J Cell Biol* 1996; 135(4):1151-1162.
- (109) Cuevas BD, Uhlik MT, Garrington TP, Johnson GL. MEKK1 regulates the AP-1 dimer repertoire via control of JunB transcription and Fra-2 protein stability. *Oncogene* 2005; 24(5):801-809.
- (110) Chinenov Y, Kerppola TK. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* 2001; 20(19):2438-2452.
- (111) Sirum-Connolly K, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 or phorbol induction of the stromelysin promoter requires an element that cooperates with AP-1. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(2):335-341.
- (112) Bos TJ, Monteclaro FS, Mitsunobu F, Ball AR, Jr., Chang CH, Nishimura T et al. Efficient transformation of chicken embryo fibroblasts by c-Jun requires structural modification in coding and noncoding sequences. *Genes Dev* 1990; 4(10):1677-1687.
- (113) Vandel L, Montreau N, Vial E, Pfarr CM, Binetruy B, Castellazzi M. Stepwise transformation of rat embryo fibroblasts: c-Jun, JunB, or JunD can cooperate with Ras for focus formation, but a c-Jun-containing heterodimer is required for immortalization. *Mol Cell Biol* 1996; 16(5):1881-1888.
- (114) Bos TJ, Margiotta P, Bush L, Wasilenko W. Enhanced cell motility and invasion of chicken embryo fibroblasts in response to Jun over-expression. *Int J Cancer* 1999; 81(3):404-410.
- (115) Smith LM, Wise SC, Hendricks DT, Sabichi AL, Bos T, Reddy P et al. cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype. *Oncogene* 1999; 18(44):6063-6070.
- (116) Tsuji M, Hirakawa K, Kato A, Fujii K. The possible role of c-fos expression in rheumatoid cartilage destruction. *J Rheumatol* 2000; 27(7):1606-1621.
- (117) Holt JT, Gopal TV, Moulton AD, Nienhuis AW. Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(13):4794-4798.
- (118) Morita Y, Kashihara N, Yamamura M, Okamoto H, Harada S, Kawashima M et al. Antisense oligonucleotides targeting c-fos mRNA inhibit rheumatoid synovial fibroblast proliferation. *Ann Rheum Dis* 1998; 57(2):122-124.
- (119) Schreiber M, Kolbus A, Piu F, Szabowski A, Mohle-Steinlein U, Tian J et al. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev* 1999; 13(5):607-619.

- (120) Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Mohle-Steinlein U, Ruther U, Wagner EF. Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* 1992; 360(6406):741-745.
- (121) Saez E, Rutberg SE, Mueller E, Oppenheim H, Smoluk J, Yuspa SH et al. c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell* 1995; 82(5):721-732.
- (122) Hilberg F, Aguzzi A, Howells N, Wagner EF. c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* 1993; 365(6442):179-181.
- (123) Leaner VD, Kinoshita I, Birrer MJ. AP-1 complexes containing cJun and JunB cause cellular transformation of Rat1a fibroblasts and share transcriptional targets. *Oncogene* 2003; 22(36):5619-5629.
- (124) Passegue E, Jochum W, Behrens A, Ricci R, Wagner EF. JunB can substitute for Jun in mouse development and cell proliferation. *Nat Genet* 2002; 30(2):158-166.
- (125) Schorpp-Kistner M, Wang ZQ, Angel P, Wagner EF. JunB is essential for mammalian placentation. *EMBO J* 1999; 18(4):934-948.
- (126) Kenner L, Hoebertz A, Beil T, Keon N, Karreth F, Eferl R et al. Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects. *J Cell Biol* 2004; 164(4):613-623.
- (127) Passegue E, Wagner EF. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J* 2000; 19(12):2969-2979.
- (128) Ryder K, Lanahan A, Perez-Albuerne E, Nathans D. jun-D: a third member of the jun gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(5):1500-1503.
- (129) Okazaki S, Ito T, Ui M, Watanabe T, Yoshimatsu K, Iba H. Two proteins translated by alternative usage of initiation codons in mRNA encoding a JunD transcriptional regulator. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250(2):347-353.
- (130) Metivier C, Piu F, Pfarr CM, Yaniv M, Loiseau L, Castellazzi M. In vitro transforming capacities of mouse c-jun:junD chimeric genes. *Oncogene* 1993; 8(8):2311-2315.
- (131) Pfarr CM, Mechta F, Spyrou G, Lallemand D, Carillo S, Yaniv M. Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell* 1994; 76(4):747-760.
- (132) Wakisaka S, Suzuki N, Saito N, Ochi T, Sakane T. Possible correction of abnormal rheumatoid arthritis synovial cell function by jun D transfection in vitro. *Arthritis Rheum* 1998; 41(3):470-481.
- (133) Pillebout E, Weitzman JB, Burtin M, Martino C, Federici P, Yaniv M et al. JunD protects against chronic kidney disease by regulating paracrine mitogens. *J Clin Invest* 2003; 112(6):843-852.
- (134) Hai T, Curran T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(9):3720-3724.

- (135) van Dam H, Castellazzi M. Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 2001; 20(19):2453-2464.
- (136) Handel ML, McMorro LB, Gravalles EM. Nuclear factor-kappa B in rheumatoid synovium. Localization of p50 and p65. *Arthritis Rheum* 1995; 38(12):1762-1770.
- (137) Georganas C, Liu H, Perlman H, Hoffmann A, Thimmapaya B, Pope RM. Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun. *J Immunol* 2000; 165(12):7199-7206.
- (138) Grimbacher B, Aicher WK, Peter HH, Eibel H. TNF-alpha induces the transcription factor Egr-1, pro-inflammatory cytokines and cell proliferation in human skin fibroblasts and synovial lining cells. *Rheumatol Int* 1998; 17(5):185-192.
- (139) Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT et al. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 1996; 382(6587):171-174.
- (140) Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA et al. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 1996; 380(6575):630-633.
- (141) Aicher WK, Heer AH, Trabandt A, Bridges SL, Jr., Schroeder HW, Jr., Stransky G et al. Overexpression of zinc-finger transcription factor Z-225/Egr-1 in synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol* 1994; 152(12):5940-5948.
- (142) Faour WH, Alaaeddine N, Mancini A, He QW, Jovanovic D, Di Battista JA. Early growth response factor-1 mediates prostaglandin E2-dependent transcriptional suppression of cytokine-induced tumor necrosis factor-alpha gene expression in human macrophages and rheumatoid arthritis-affected synovial fibroblasts. *J Biol Chem* 2005; 280(10):9536-9546.
- (143) Aicher WK, Alexander D, Haas C, Kuchen S, Pagenstecher A, Gay S et al. Transcription factor early growth response 1 activity up-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2003; 48(2):348-359.
- (144) Otero LJ, Ashe MP, Sachs AB. The yeast poly(A)-binding protein Pab1p stimulates in vitro poly(A)-dependent and cap-dependent translation by distinct mechanisms. *EMBO J* 1999; 18(11):3153-3163.
- (145) Santiago TC, Bettany AJ, Purvis IJ, Brown AJ. Messenger RNA stability in *Saccharomyces cerevisiae*: the influence of translation and poly(A) tail length. *Nucleic Acids Res* 1987; 15(6):2417-2429.
- (146) Gao M, Fritz DT, Ford LP, Wilusz J. Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro. *Mol Cell* 2000; 5(3):479-488.
- (147) Lewin B. *Molekularbiologie der Gene*. 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 1998.

- (148) Chen CY, Xu N, Shyu AB. mRNA decay mediated by two distinct AU-rich elements from c-fos and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transcripts: different deadenylation kinetics and uncoupling from translation. *Mol Cell Biol* 1995; 15(10):5777-5788.
- (149) Clark A. Post-transcriptional regulation of pro-inflammatory gene expression. *Arthritis Res* 2000; 2(3):172-174.
- (150) Ryseck RP, Hirai SI, Yaniv M, Bravo R. Transcriptional activation of c-jun during the G0/G1 transition in mouse fibroblasts. *Nature* 1988; 334(6182):535-537.
- (151) Nakamaki T, Imamura J, Brewer G, Tsuruoka N, Koeffler HP. Characterization of adenosine-uridine-rich RNA binding factors. *J Cell Physiol* 1995; 165(3):484-492.
- (152) Kiledjian M, DeMaria CT, Brewer G, Novick K. Identification of AUF1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D) as a component of the alpha-globin mRNA stability complex. *Mol Cell Biol* 1997; 17(8):4870-4876.
- (153) Taylor GA, Lai WS, Oakey RJ, Seldin MF, Shows TB, Eddy RL, Jr. et al. The human TTP protein: sequence, alignment with related proteins, and chromosomal localization of the mouse and human genes. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(12):3454.
- (154) Wilusz CJ, Wormington M, Peltz SW. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(4):237-246.
- (155) Ma WJ, Cheng S, Campbell C, Wright A, Furneaux H. Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J Biol Chem* 1996; 271(14):8144-8151.
- (156) Ford LP, Watson J, Keene JD, Wilusz J. ELAV proteins stabilize deadenylated intermediates in a novel in vitro mRNA deadenylation/degradation system. *Genes Dev* 1999; 13(2):188-201.
- (157) Fan XC, Steitz JA. Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J* 1998; 17(12):3448-3460.
- (158) Raghavan A, Robison RL, McNabb J, Miller CR, Williams DA, Bohjanen PR. HuA and tristetraprolin are induced following T cell activation and display distinct but overlapping RNA binding specificities. *J Biol Chem* 2001; 276(51):47958-47965.
- (159) Myer VE, Fan XC, Steitz JA. Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay. *EMBO J* 1997; 16(8):2130-2139.
- (160) Chen CY, Xu N, Shyu AB. Highly selective actions of HuR in antagonizing AU-rich element-mediated mRNA destabilization. *Mol Cell Biol* 2002; 22(20):7268-7278.
- (161) Atasoy U, Watson J, Patel D, Keene JD. ELAV protein HuA (HuR) can redistribute between nucleus and cytoplasm and is upregulated during serum stimulation and T cell activation. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 21):3145-3156.

- (162) Peng SS, Chen CY, Xu N, Shyu AB. RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J* 1998; 17(12):3461-3470.
- (163) Dean JL, Wait R, Mahtani KR, Sully G, Clark AR, Saklatvala J. The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol* 2001; 21(3):721-730.
- (164) Blaxall BC, Pende A, Wu SC, Port JD. Correlation between intrinsic mRNA stability and the affinity of AUF1 (hnRNP D) and HuR for A+U-rich mRNAs. *Mol Cell Biochem* 2002; 232(1-2):1-11.
- (165) Wagner BJ, DeMaria CT, Sun Y, Wilson GM, Brewer G. Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics* 1998; 48(2):195-202.
- (166) Sarkar B, Xi Q, He C, Schneider RJ. Selective degradation of AU-rich mRNAs promoted by the p37 AUF1 protein isoform. *Mol Cell Biol* 2003; 23(18):6685-6693.
- (167) Gouble A, Grazide S, Meggetto F, Mercier P, Delsol G, Morello D. A new player in oncogenesis: AUF1/hnRNP D overexpression leads to tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Res* 2002; 62(5):1489-1495.
- (168) Worthington MT, Pelo JW, Sachedina MA, Applegate JL, Arseneau KO, Pizarro TT. RNA binding properties of the AU-rich element-binding recombinant Nup475/TIS11/tristetraprolin protein. *J Biol Chem* 2002; 277(50):48558-48564.
- (169) Blackshear PJ. Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(Pt 6):945-952.
- (170) Cao H, Tuttle JS, Blackshear PJ. Immunological characterization of tristetraprolin as a low abundance, inducible, stable cytosolic protein. *J Biol Chem* 2004; 279(20):21489-21499.
- (171) Ogawa K, Chen F, Kim YJ, Chen Y. Transcriptional regulation of tristetraprolin by transforming growth factor-beta in human T cells. *J Biol Chem* 2003; 278(32):30373-30381.
- (172) Suzuki K, Nakajima H, Ikeda K, Maezawa Y, Suto A, Takatori H et al. IL-4-Stat6 signaling induces tristetraprolin expression and inhibits TNF-alpha production in mast cells. *J Exp Med* 2003; 198(11):1717-1727.
- (173) Brooks SA, Connolly JE, Diegel RJ, Fava RA, Rigby WF. Analysis of the function, expression, and subcellular distribution of human tristetraprolin. *Arthritis Rheum* 2002; 46(5):1362-1370.
- (174) Taylor GA, Carballo E, Lee DM, Lai WS, Thompson MJ, Patel DD et al. A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity* 1996; 4(5):445-454.
- (175) Anderson P, Phillips K, Stoecklin G, Kedersha N. Post-transcriptional regulation of proinflammatory proteins. *J Leukoc Biol* 2004; 76(1):42-47.

- (176) Phillips K, Kedersha N, Shen L, Blackshear PJ, Anderson P. Arthritis suppressor genes TIA-1 and TTP dampen the expression of tumor necrosis factor alpha, cyclooxygenase 2, and inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(7):2011-2016.
- (177) Tsutsumi A, Suzuki E, Adachi Y, Murata H, Goto D, Kojo S et al. Expression of tristetraprolin (G0S24) mRNA, a regulator of tumor necrosis factor-alpha production, in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2004; 31(6):1044-1049.
- (178) Voet D, Voet JG. *Biochemie*. 1.Auflage. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim; 1994.
- (179) Löffler G, Petrides P. *Biochemie & Pathobiochemie*. 7. Auflage. Springer, Berlin; 2003.
- (180) Jentsch TJ, Maritzen T, Zdebik AA. Chloride channel diseases resulting from impaired transepithelial transport or vesicular function. *J Clin Invest* 2005; 115(8):2039-2046.
- (181) Romano JW, Ehrhart JC, Duthu A, Kim CM, Appella E, May P. Identification and characterization of a p53 gene mutation in a human osteosarcoma cell line. *Oncogene* 1989; 4(12):1483-1488.
- (182) Kaelin WG, Jr. The emerging p53 gene family. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(7):594-598.
- (183) Inazuka M, Tahira T, Horiuchi T, Harashima S, Sawabe T, Kondo M et al. Analysis of p53 tumour suppressor gene somatic mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39(3):262-266.
- (184) Pollock R, Lang A, Ge T, Sun D, Tan M, Yu D. Wild-type p53 and a p53 temperature-sensitive mutant suppress human soft tissue sarcoma by enhancing cell cycle control. *Clin Cancer Res* 1998; 4(8):1985-1994.
- (185) Gjerset RA, Lebedeva S, Haghighi A, Turla ST, Mercola D. Inhibition of the Jun kinase pathway blocks DNA repair, enhances p53-mediated apoptosis and promotes gene amplification. *Cell Growth Differ* 1999; 10(8):545-554.
- (186) Dunger S, Prechtel J, Kinne R. Influence of point mutations in cfos and cjun proto-oncogenes on the expression of MMP-1 and TIMP-1 in synovial fibroblasts. *Z Rheumatol, Supplement* 2003; 62(1):I/42.
- (187) Schalin-Jantti C, Valli-Jaakola K, Oksanen L, Martelin E, Laitinen K, Krusius T et al. Melanocortin-3-receptor gene variants in morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27(1):70-74.
- (188) Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res* 1998; 58(23):5321-5325.

- (189) Kaijzel EL, van Krugten MV, Brinkman BM, Huizinga TW, van der ST, Hazes JM et al. Functional analysis of a human tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis. *Mol Med* 1998; 4(11):724-733.
- (190) Barnes KC, Caraballo L, Munoz M, Zambelli-Weiner A, Ehrlich E, Burki M et al. A novel promoter polymorphism in the gene encoding complement component 5 receptor 1 on chromosome 19q13.3 is not associated with asthma and atopy in three independent populations. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(5):736-744.
- (191) Huizinga TW, Pisetsky DS, Kimberly RP. Associations, populations, and the truth: recommendations for genetic association studies in Arthritis & Rheumatism. *Arthritis Rheum* 2004; 50(7):2066-2071.
- (192) Cardon LR, Bell JL. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001; 2(2):91-99.
- (193) Moraes MO, Santos AR, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Ottenhoff TH, Moraes ME et al. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. *Immunogenetics* 2003; 54(12):896-899.
- (194) Amaral MD, Pacheco P, Beck S, Farinha CM, Penque D, Nogueira P et al. Cystic fibrosis patients with the 3272-26A>G splicing mutation have milder disease than F508del homozygotes: a large European study. *J Med Genet* 2001; 38(11):777-783.
- (195) Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RG, Huizinga TW, Kimberly RP. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001; 166(6):3915-3922.
- (196) Crilly A, Bartlett JM, White A, Stirling D, Capell H, Madhok R. Investigation of novel polymorphisms within the 3' region of the IL-6 gene in patients with rheumatoid arthritis using Genescan analysis. *Cytokine* 2001; 13(2):109-112.
- (197) Morgan AW, Griffiths B, Ponchel F, Montague BM, Ali M, Gardner PP et al. Fc gamma receptor type IIIA is associated with rheumatoid arthritis in two distinct ethnic groups. *Arthritis Rheum* 2000; 43(10):2328-2334.
- (198) van der Helm-van Mil AH, Dieude P, Schonkeren JJ, Cornelis F, Huizinga TW. No association between tumour necrosis factor receptor type 2 gene polymorphism and rheumatoid arthritis severity: a comparison of the extremes of phenotypes. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(10):1232-1234.
- (199) Ehara Y, Sakurai D, Tsuchiya N, Nakano K, Tanaka Y, Yamaguchi A et al. Follistatin-related protein gene (FRP) is expressed in the synovial tissues of rheumatoid arthritis, but its polymorphisms are not associated with genetic susceptibility. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22(6):707-712.
- (200) Tokuhira S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T et al. An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2003; 35(4):341-348.

- (201) Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S, Sawada T et al. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nat Genet* 2005; 37(5):478-485.
- (202) Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2003; 34(4):395-402.
- (203) Caponi L, Petit-Teixeira E, Sebbag M, Bongiorno F, Moscato S, Pratesi F et al. A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the PADI4 gene in a white French population. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(4):587-593.
- (204) Barton A, John S, Ollier WE, Silman A, Worthington J. Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians. *Arthritis Rheum* 2001; 44(1):61-65.
- (205) Dieude P, Petit E, Cailleau-Moindrault S, Osorio J, Pierlot C, Martinez M et al. Association between tumor necrosis factor receptor II and familial, but not sporadic, rheumatoid arthritis: evidence for genetic heterogeneity. *Arthritis Rheum* 2002; 46(8):2039-2044.
- (206) Devauchelle V, Marion S, Cagnard N, Mistou S, Falgarone G, Breban M et al. DNA microarray allows molecular profiling of rheumatoid arthritis and identification of pathophysiological targets. *Genes Immun* 2004; 5(8):597-608.
- (207) Mosse YP, Greshock J, Margolin A, Naylor T, Cole K, Khazi D et al. High-resolution detection and mapping of genomic DNA alterations in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 43(4):390-403.
- (208) Tejedor D, Castillo S, Mozas P, Jimenez E, Lopez M, Tejedor MT et al. Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 2005; 51(7):1137-1144.
- (209) Lamichhane G, Tyagi S, Bishai WR. Designer arrays for defined mutant analysis to detect genes essential for survival of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lungs. *Infect Immun* 2005; 73(4):2533-2540.
- (210) Wong KK, Tsang YT, Shen J, Cheng RS, Chang YM, Man TK et al. Allelic imbalance analysis by high-density single-nucleotide polymorphic allele (SNP) array with whole genome amplified DNA. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(9):69.
- (211) Sachse K, Hotzel H, Slickers P, Ellinger T, Ehrlich R. DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila* spp. *Mol Cell Probes* 2005; 19(1):41-50.
- (212) Gunther S, Groth I, Grabley S, Munder T. Design and evaluation of an oligonucleotide-microarray for the detection of different species of the genus *Kitasatospora*. *J Microbiol Methods* 2005.
- (213) Perreten V, Vorlet-Fawer L, Slickers P, Ehrlich R, Kuhnert P, Frey J. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *J Clin Microbiol* 2005; 43(5):2291-2302.

- (214) Kovary K, Bravo R. The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1991; 11(9):4466-4472.
- (215) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31(3):315-324.
- (216) Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986; 29(8):1039-1049.
- (217) Kasperkovitz PV, Timmer TC, Smeets TJ, Verbeet NL, Tak PP, van Baarsen LG et al. Fibroblast-like synoviocytes derived from patients with rheumatoid arthritis show the imprint of synovial tissue heterogeneity: evidence of a link between an increased myofibroblast-like phenotype and high-inflammation synovitis. *Arthritis Rheum* 2005; 52(2):430-441.
- (218) Kunisch E, Fuhrmann R, Roth A, Winter R, Lungershausen W, Kinne RW. Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Ann Rheum Dis* 2004; 63(7):774-784.
- (219) Panaro NJ, Yuen PK, Sakazume T, Fortina P, Kricka LJ, Wilding P. Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the agilent 2100 bioanalyzer. *Clin Chem* 2000; 46(11):1851-1853.
- (220) Nachamkin I, Panaro NJ, Li M, Ung H, Yuen PK, Kricka LJ et al. Agilent 2100 bioanalyzer for restriction fragment length polymorphism analysis of the *Campylobacter jejuni* flagellin gene. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2):754-757.
- (221) de Martin R, Strasswimmer J, Philipson L. A new luciferase promoter insertion vector for the analysis of weak transcriptional activities. *Gene* 1993; 124(1):137-138.
- (222) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Woodbury; 1989.
- (223) Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7(6):1513-1523.
- (224) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150(1):76-85.
- (225) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839):487-491.
- (226) Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin* 1990; 48(8):579-582.

- (227) Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-350.
- (228) Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 1992; 10(4):413-417.
- (229) Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6(10):986-994.
- (230) Haas C, Aicher WK, Dinkel A, Peter HH, Eibel H. Characterization of SV40T antigen immortalized human synovial fibroblasts: maintained expression patterns of EGR-1, HLA-DR and some surface receptors. *Rheumatol Int* 1997; 16(6):241-247.
- (231) Renard P, Ernest I, Houbion A, Art M, Le Calvez H, Raes M et al. Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(4):E21.
- (232) Goldrick MM, Kimball GR, Liu Q, Martin LA, Sommer SS, Tseng JY. NIRCA: a rapid robust method for screening for unknown point mutations. *Biotechniques* 1996; 21(1):106-112.
- (233) Dunger S, Neumann S, Zell R, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Paschke R et al. Mutation detection in mosaic situations: RNA mismatch assay and denaturing gradient gel electrophoresis are more sensitive than conventional cycle sequencing. *Anal Biochem* 2001; 294(1):89-93.
- (234) Alderborn A, Kristofferson A, Hammerling U. Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing. *Genome Res* 2000; 10(8):1249-1258.
- (235) Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 2001; 11(1):3-11.
- (236) McNabb DS, Reed R, Marciniak RA. Dual luciferase assay system for rapid assessment of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2005; 4(9):1539-1549.
- (237) Poxon SW, Hughes JA. A biofunctional assay to study pRL-CMV plasmid DNA formulation stability. *PDA J Pharm Sci Technol* 1999; 53(6):314-317.
- (238) Cormier MJ, Hori K. Studies on the bioluminescence of renilla reniformis. IV. Non-enzymatic activation of renilla luciferin. *Biochim Biophys Acta* 1964; 88:99-104.
- (239) Gates BJ, DeLuca M. The production of oxyluciferin during the firefly luciferase light reaction. *Arch Biochem Biophys* 1975; 169(2):616-621.
- (240) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(12):5463-5467.
- (241) Huber R. Analyse der Expression und Detektion von potentiellen mutationen des Proto-Onkogenes junD in der Synovialmembran von Patienten mit chronischer Polyarthrititis. DIPLOMARBEIT. Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena; 2001.

- (242) Dunger S, Huber R, Ukena B, SS, Kinne R. Untersuchungen zu Rolle des AP-1 Komplexes in der rheumatoiden Arthritis (RA). *Z Rheumatol, Supplement* 2001; 60(1):I/64.
- (243) Horn M, Volland R. Multiple Tests und Auswahlverfahren. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart; 1995.
- (244) Nozaki K, Boccalini P, Moskowitz MA. Expression of c-fos-like immunoreactivity in brainstem after meningeal irritation by blood in the subarachnoid space. *Neuroscience* 1992; 49(3):669-680.
- (245) Shiu YT, Li S, Yuan S, Wang Y, Nguyen P, Chien S. Shear stress-induced c-fos activation is mediated by Rho in a calcium-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303(2):548-555.
- (246) Baar K, Blough E, Dineen B, Esser K. Transcriptional regulation in response to exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 1999; 27:333-379.
- (247) Asahara H, Hasunuma T, Kobata T, Inoue H, Muller-Ladner U, Gay S et al. In situ expression of protooncogenes and Fas/Fas ligand in rheumatoid arthritis synovium. *J Rheumatol* 1997; 24(3):430-435.
- (248) Grimbacher B, Aicher WK, Peter HH, Eibel H. Measurement of transcription factor c-fos and EGR-1 mRNA transcription levels in synovial tissue by quantitative RT-PCR. *Rheumatol Int* 1997; 17(3):109-112.
- (249) Roivainen A, Soderstrom KO, Pirila L, Aro H, Kortekangas P, Merilahti-Palo R et al. Oncoprotein expression in human synovial tissue: an immunohistochemical study of different types of arthritis. *Br J Rheumatol* 1996; 35(10):933-942.
- (250) Jawaheer D, Gregersen PK. Rheumatoid arthritis. The genetic components. *Rheum Dis Clin North Am* 2002; 28(1):1-15, v.
- (251) Yamanishi Y, Boyle DL, Green DR, Keystone EC, Connor A, Zollman S et al. p53 tumor suppressor gene mutations in fibroblast-like synoviocytes from erosion synovium and non-erosion synovium in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(1):R12-R18.
- (252) Seemayer CA, Kuchen S, Neidhart M, Kuenzler P, Rihoskova V, Neumann E et al. p53 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts at sites of invasion. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(12):1139-1144.
- (253) Meyer LH, Pap T. MAPK signalling in rheumatoid joint destruction: can we unravel the puzzle? *Arthritis Res Ther* 2005; 7(5):177-178.
- (254) Stylianou E, Saklatvala J. Interleukin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30(10):1075-1079.
- (255) Dooley S, Herlitzka I, Hanselmann R, Ermis A, Henn W, Remberger K et al. Constitutive expression of c-fos and c-jun, overexpression of ets-2, and reduced expression of metastasis suppressor gene nm23-H1 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996; 55(5):298-304.

- (256) Qu Z, Garcia CH, O'Rourke LM, Planck SR, Kohli M, Rosenbaum JT. Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining. *Arthritis Rheum* 1994; 37(2):212-220.
- (257) Morita Y, Kashihara N, Yamamura M, Okamoto H, Harada S, Maeshima Y et al. Inhibition of rheumatoid synovial fibroblast proliferation by antisense oligonucleotides targeting proliferating cell nuclear antigen messenger RNA. *Arthritis Rheum* 1997; 40(7):1292-1297.
- (258) Foletta VC, Segal DH, Cohen DR. Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J Leukoc Biol* 1998; 63(2):139-152.
- (259) Vandel L, Pfarr CM, Huguier S, Loiseau L, Sergeant A, Castellazzi M. Increased transforming activity of JunB and JunD by introduction of an heterologous homodimerization domain. *Oncogene* 1995; 10(3):495-507.
- (260) Knapp JI, Heppner C, Hickman AB, Burns AL, Chandrasekharappa SC, Collins FS et al. Identification and characterization of JunD missense mutants that lack menin binding. *Oncogene* 2000; 19(41):4706-4712.
- (261) Agarwal SK, Novotny EA, Crabtree JS, Weitzman JB, Yaniv M, Burns AL et al. Transcription factor JunD, deprived of menin, switches from growth suppressor to growth promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(19):10770-10775.
- (262) Pohlers D, Siegling A, Buchner E, Schmidt-Weber CB, Palombo-Kinne E, Emmrich F et al. Expression of cytokine mRNA and protein in joints and lymphoid organs during the course of rat antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(3):R445-R457.
- (263) Schedel J, Distler O, Woenckhaus M, Gay RE, Simmen B, Michel BA et al. Discrepancy between mRNA and protein expression of tumour suppressor maspin in synovial tissue may contribute to synovial hyperplasia in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63(10):1205-1211.
- (264) Von Euler H, Khoshnoud R, He Q, Khoshnoud A, Fornander T, Rutqvist LE et al. Time-dependent RNA degradation affecting cDNA array quality in spontaneous canine tumours sampled using standard surgical procedures. *Int J Mol Med* 2005; 16(6):979-985.
- (265) Preece P, Virley DJ, Costandi M, Coombes R, Moss SJ, Mudge AW et al. An optimistic view for quantifying mRNA in post-mortem human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 116(1-2):7-16.
- (266) Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Findlay DM. Stability of RNA isolated from human trabecular bone at post-mortem and surgery. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1740(1):1-11.
- (267) Dixon DA. Dysregulated post-transcriptional control of COX-2 gene expression in cancer. *Curr Pharm Des* 2004; 10(6):635-646.

- (268) Linker K, Pautz A, Fechir M, Hubrich T, Greeve J, Kleinert H. Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(15):4813-4827.
- (269) Spiro C, Bazett-Jones DP, Wu X, McMurray CT. DNA structure determines protein binding and transcriptional efficiency of the proenkephalin cAMP-responsive enhancer. *J Biol Chem* 1995; 270(46):27702-27710.
- (270) Zuckerkandl E. Why so many noncoding nucleotides? The eukaryote genome as an epigenetic machine. *Genetica* 2002; 115(1):105-129.
- (271) Inouye S, Gomada M, Sangodkar UM, Nakazawa A, Nakazawa T. Upstream regulatory sequence for transcriptional activator XylR in the first operon of xylene metabolism on the TOL plasmid. *J Mol Biol* 1990; 216(2):251-260.
- (272) Seyffert W, Balling R, Bunse A, de Couet HG. *Lehrbuch der Genetik*. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 2003.
- (273) Kothekar V, Kumar A. Stereochemical aspects of interaction of DNA binding domain of human progesterone receptor with d(AGGTCATGCT)₂. *Indian J Biochem Biophys* 1992; 29(3):236-244.
- (274) Kitabayashi I, Chiu R, Gachelin G, Yokoyama K. E1A dependent up-regulation of c-jun/AP-1 activity. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(3):649-655.
- (275) Wei P, Inamdar N, Vedeckis WV. Transrepression of c-jun gene expression by the glucocorticoid receptor requires both AP-1 sites in the c-jun promoter. *Mol Endocrinol* 1998; 12(9):1322-1333.
- (276) Hyder SM, Nawaz Z, Chiappetta C, Yokoyama K, Stancel GM. The protooncogene c-jun contains an unusual estrogen-inducible enhancer within the coding sequence. *J Biol Chem* 1995; 270(15):8506-8513.
- (277) Perez-Albuerne ED, Schatteman G, Sanders LK, Nathans D. Transcriptional regulatory elements downstream of the JunB gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(24):11960-11964.
- (278) Plaza S, Saule S, Dozier C. High conservation of cis-regulatory elements between quail and human for the Pax-6 gene. *Dev Genes Evol* 1999; 209(3):165-173.
- (279) Gelfand MS. Recognition of regulatory sites by genomic comparison. *Res Microbiol* 1999; 150(9-10):755-771.
- (280) Gelfand MS, Koonin EV, Mironov AA. Prediction of transcription regulatory sites in Archaea by a comparative genomic approach. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(3):695-705.
- (281) Mrowka R, Steinhage K, Patzak A, Persson PB. An evolutionary approach for identifying potential transcription factor binding sites: the renin gene as an example. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284(4):R1147-R1150.
- (282) Bohmann D, Tjian R. Biochemical analysis of transcriptional activation by Jun: differential activity of c- and v-Jun. *Cell* 1989; 59(4):709-717.

- (283) Vogt PK, Morgan IM, Havarstein L, Su H, Hartl M, Schuur E. The oncogenicity of Jun. *Leukemia* 1992; 6 Suppl 3:184S-186S.
- (284) Hattori K, Angel P, Le Beau MM, Karin M. Structure and chromosomal localization of the functional intronless human JUN protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(23):9148-9152.
- (285) Nomura N, Ide M, Sasamoto S, Matsui M, Date T, Ishizaki R. Isolation of human cDNA clones of jun-related genes, jun-B and jun-D. *Nucleic Acids Res* 1990; 18(10):3047-3048.
- (286) Berger I, Shaul Y. Structure and function of human jun-D. *Oncogene* 1991; 6(4):561-566.
- (287) Newton CR, Graham A. PCR. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 1997.
- (288) Al Soud WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2):485-493.
- (289) Hashimoto K, Ishimori Y. Preliminary evaluation of electrochemical PNA array for detection of single base mismatch mutations. *Lab Chip* 2001; 1(1):61-63.
- (290) Steward GF, Jenkins BD, Ward BB, Zehr JP. Development and testing of a DNA microarray to assess nitrogenase (nifH) gene diversity. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(3):1455-1465.
- (291) John S, Shephard N, Liu G, Zeggini E, Cao M, Chen W et al. Whole-genome scan, in a complex disease, using 11,245 single-nucleotide polymorphisms: comparison with microsatellites. *Am J Hum Genet* 2004; 75(1):54-64.
- (292) Consolandi C, Frosini A, Pera C, Ferrara GB, Bordoni R, Castiglioni B et al. Polymorphism analysis within the HLA-A locus by universal oligonucleotide array. *Hum Mutat* 2004; 24(5):428-434.
- (293) Divne AM, Allen M. A DNA microarray system for forensic SNP analysis. *Forensic Sci Int* 2005; 154(2-3):111-121.

Anhang

Im Anhang ist das folgende Material enthalten:

Anhang A: Anhang zu Material und Methoden

Anhang A1: Ausführliche Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmittel

Tabellen:

Tabelle A1: Patientendaten

Tabelle A2: Primersequenzen und sequenzspezifische PCR-Bedingungen für die NIRCA-Fragmentsynthese und für die Synthese der Fragmente zur Klonierung der mutierten Fragmente und der Wildtyp-Kontrollen in pUC19

Tabelle A3: Primersequenzen und sequenzspezifische PCR-Bedingungen für die Synthese der Fragmente zur Klonierung der Promotorabschnitte in den Vektor pUBT-luc

Tabelle A4: Primersequenzen und sequenzspezifische PCR-Bedingungen für die (asymmetrische) Synthese der ArrayTube-Fragmente

Tabelle A5: Primersequenzen und genspezifische PCR-Bedingungen für die Synthese der Fragmente zur Klonierung der externen Standards (für die „real-time“ PCR)

Tabelle A6: Primersequenzen und genspezifische „real-time“ PCR-Bedingungen

Tabelle A7: Sequenzen der für das Pyrosequencing eingesetzten Primer

Tabelle A8: Layout des zur Optimierung der Versuchsbedingungen eingesetzten DNA-Microarrays RHEUMA_1

Tabelle A9: Layout des zur Analyse der Patienten- und Kontrollproben eingesetzten DNA-Microarrays RHEUMA_3

Tabelle A10: Definition der Sonden-Spots auf dem DNA-Microarray RHEUMA_1

Tabelle A11: Definition der Sonden-Spots auf dem DNA-Microarray RHEUMA_3

Tabelle A12: Ablauf der einzelnen Versuchsschritte eines AT-Versuches

Tabelle A13: Parametervariationen bei der Optimierung der AT-Versuche

Anhang B: Anhang zu den Ergebnissen

Abbildung B1: Korrelationsanalyse der jun-/fos-mRNA- und Proteinexpression

Danksagung

Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang

Publikationsverzeichnis

Selbständigkeitserklärung

Erklärung zur Dissertation

Anhang A: Anhang zu Material und Methoden

Anhang A1: Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmittel

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Active Motif, Rixensart, Belgien:

Nuclear Extract Kit

TransAM AP-1 Family Kit

Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland:

RNA 6000 LabChip Kit

Ambion, Austin, TX, USA:

Agarose HR

MutationScreener

RNase-freies Wasser

Becton Dickinson, San Jose, CA, USA:

Agar für LB-Agar

BD Mercury TransFactor cJun Kit

Trypton

Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland:

Rindergammaglobulin

Biotage, Scottsdale, AZ, USA:

Pyro Gold Reagents

Biowhittaker, Walkersville, MN, USA:

FCS

Clontech, Jena, Deutschland:

DNA-Microarray RHEUMA 1

DNA-Microarray RHEUMA 3

Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland:

T4-DNA-Ligase

Fluka Chemie, Buchs, Schweiz:

Hefe-Extrakt

Gibco, Karlsruhe, Deutschland:

1 kb Plus DNA Ladder

100 bp DNA Ladder

Hoechst, Frankfurt/Main, Deutschland:

4'-6 Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

Bisbenzimid (Hoechst 33258)

KPL, Gaithersburg, MD, USA:

Tetramethylbenzidin (TMB)

Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland:

Agarose/UltraPURE Agarose
Superscript II Reverse Transcriptase
Taq-DNA-Polymerase

Machery-Nagel, Düren, Deutschland:

endotoxinfreies Wasser
Nucleobond PC 100 Kit
NucleoBond PC 500 EF Kit
Nucleospin Plus Kit

Molecular BioProducts, San Diego, USA:

RNase away

New England Biolabs, Ipswich, MA, USA:

Restriktionsenzyme (*Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Not* I)

PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland:

Amphotericin B
Ampicillin
DMEM
Penicillin
Streptomycin

PE Applied Biosystems, Warrington, GB:

Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

Pierce, Rockford, IL, USA:

BCA-Assay
Streptavidin-HRP
SuperSignal Femto West
SuperSignal Pico West

Promega Corporation, Madison, WI, USA:

Dual luciferase assay system

Qiagen, Hilden, Deutschland:

Polyfect Transfection Reagent
QIAamp Mini Kit
QIAquick Purification Kit
RNase-freie DNase I
RNeasy Mini Kit

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland:

biotinyliertes dUTP
dNTPs
Fast start reaction Kit
humane DNA
Kollagenase P
Trypsin

Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland:

TEMED
APS

Tabelle A1: Klinische Daten der untersuchten Patienten.

Patient	Geschlecht	Alter*	Dauer der Erkrankung*	RF	BSG in mm/h	CRP in mg/l	Anzahl der ARA-Kriterien
OA							
EB8	m	61	0.3	-	14	4	1
EB9	f	76	0.6	-	18	8	1
EB10	f	92	0.1	-	14	6	0
EB12	f	79	0.4	+	14	4	1
EB13	m	72	0.3	-	2	4	0
EB14	f	68	0.4	-	4	3	0
EB15	f	63	0.2	-	20	5	0
EB16	f	69	0.5	-	86	10	1
EB17	f	71	0.5	+	14	8	0
EB18	f	68	0.3	-	9	3	1
EB19	f	70	0.3	-	6	1	1
EB21	f	77	0.1	-	38	27	0
EB22	m	76	0.2	-	30	4	0
EB24	f	71	0.8	-	29	5	0
EB29	f	76	0.2	-	13	0	1
EB43	m	53	0.5	-	2	1	0
EB45	f	79	10	-	23	6	0
EB47	f	64	0.1	-	10	2	1
EB51	f	72	0.2	+	15	0	0
EB57	m	73	0.5	-	6	0	0
EB59	f	69	0.2	-	13	1	0
EB61	m	73	0.5	-	12	14	0
EB67	f	70	0.3	-	10	0	0
EB75	f	72	10	+	16	3	0
EB76	f	72	0.7	-	8	2	0
EB77	f	66	0.5	-	2	0	0
EB78	f	72	0.7	-	49	3	0
EB79	f	77	0.4	-	44	8	0
EB80	f	76	0.5	+	10	1	0
EB81	f	56	0.3	-	14	4	0
EB82	m	62	0.2	-	10	2	0
EB83	m	77	0.2	+	10	0	0
EB90	f	61	0.2	-	18	0	0
EB93	m	84	0.5	-	10	2	0
EB97	m	78	0.5	-	22	15	0
EB134	f	71	0.2	-	17	6	0
EB139	f	70	0.1	-	9	0	0
EB140	f	66	30	+	9	0	0
EB143	m	73	0.3	-	10	2	0
EB144	f	63	0.6	-	20	0	0
EB145	f	80	0.5	+	25	17	0
EB147	m	74	0.1	-	21	1	0
EB150	f	62	0.5	-	11	4	0
EB151	m	76	0.8	-	5	1	0
EB154	f	73	0.5	-	16	17	0
EB155	m	62	10	-	0	0	0
EB156	f	58	0.4	+	10	1	0
EB157	f	73	0.6	-	11	5	0
EB161	m	54	0.3	-	8	6	0
EB162	f	74	0.5	+	12	2	0

Patient	Geschlecht	Alter*	Dauer der Erkrankung*	RF	BSG in mm/h	CRP in mg/l	Anzahl der ARA-Kriterien
RA							
EB3	f	60	20	+	82	31	5
EB4	f	68	10	+	58	85	5
EB6	f	77	10	+	88	68	5
EB7	m	48	0.2	+	76	136	6
EB20	m	75	0.1	-	29	22	6
EB23	f	55	00	+	54	10	4
EB25	f	67	0.2	+	18	3	6
EB26	m	60	20	+	68	69	4
EB27	f	79	0.5	+	40	39	6
EB28	m	58	24	+	28	21	5
EB30	f	63	14	+	68	36	6
EB31	f	78	0.2	+	52	9	4
EB35	f	66	25	+	62	53	7
EB40	f	64	24	+	18	3	4
EB41	f	63	17	+	34	8	4
EB46	m	73	19	+	29	15	4
EB50	f	46	0.1	+	16	6	4
EB52	m	76	0.5	+	45	39	6
EB53	f	48	34	+	2	0	6
EB55	f	46	14	+	60	3	6
EB56	f	46	14	+	60	3	6
EB58	f	74	0.5	+	12	12	5
EB60	f	60	13	+	25	15	5
EB62	f	66	50	+	36	24	5
EB63	m	43	0.7	-	20	6	4
EB64	f	46	14	+	85	29	6
EB65	f	77	0.1	+	80	96	0
EB68	m	65	0.5	+	4	2	5
EB71	f	66	50	+	52	14	7
EB73	m	68	0.8	+	90	48	6
EB74	f	71	17	+	45	27	6
EB88	f	62	10	+	90	170	6
EB89	f	62	0.1	-	40	11	4
EB96	m	67	0.4	+	68	76	4
EB103	f	54	0.1	+	60	18	5
EB108	f	72	45	+	70	71	7
EB133	f	76	0.1	+	39	3	3
EB137	m	49	10	+	38	5	5
EB141	f	73	0.1	+	57	14	5
EB146	f	54	0.5	+	21	7	6
EB148	f	54	0.3	+	25	31	4
EB149	f	46	0.2	+	36	23	4
EB153	m	60	11	+	36	24	6
EB159	f	44	0.8	-	36	26	2
EB164	f	27	0.1	-	7	5	0

* : in Jahren, zum Zeitpunkt der Operation

RF : Rheumafaktor

BSG : Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit

CRP : C-reaktives Protein (normale Konzentration: <5 mg/l)

m : männlich

w : weiblich

+: positiv

- : negativ

Tabelle A2: Primersequenzen und sequenzspezifische PCR-Bedingungen für die NIRCA-Fragmentsynthese und für die Synthese der Fragmente zur Klonierung der mutierten Fragmente und der Wildtyp-Kontrollen in pUC19.

Primeraufbau:

Primer upstream: T7-RNA-Polymerase-Bindungsstelle + *Eco* RI-Schnittstelle + Primer-Bindungsstelle

Primer downstream: T7-RNA-Polymerase-Bindungsstelle + *Bam* HI-Schnittstelle + Primer-Bindungsstelle

DNA-Abschnitt	Primer upstream (5'→3')	Primer downstream (3'→5')	Produkt (in bp)	Amplifikationsprotokoll (45 Zyklen)
cjun-Promotor I	5'- AGAGCCTGGTCTCCAGCCGCCCC -3' (Position: -779)	5'- TGCCCGTTGCTGGACTGGATTATC -3' (Position: +260)	1039	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 60°C, Amplifikation: 180 s, 72°C
cjun-Promotor II	5'- ACCGTCGCTCCTGAA -3' (Position: -1736)	5'- GCCACTTGTCTCCGGGT -3' (Position: -619)	1117	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 55°C, Amplifikation: 180 s, 72°C
junB-Promotor I	5'- TCCTCCGTCCTGTGAAAATTCCAG -3' (Position: -842)	5'- CGCTTTGAGACTCCGGTAGGGGTC -3' (Position: +156)	1050	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 53°C, Amplifikation: 180 s, 72°C
junB-Promotor II	5'- CCTGTGCCCTAATATGGGCGGC -3' (Position: -1831)	5'- TCCCAGTATGTGCGAAGAAACC -3' (Position: -640)	1192	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 56°C, Amplifikation: 180 s, 72°C
junD-Promotor I	5'- AGATCGGTCGTACACAGCGGT -3' (Position: -400)	5'- CAGCGTCAGCGGTCCTTCTTCATC -3' (Position: +156)	556	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 59°C, Amplifikation: 180 s, 72°C
junD-Promotor II	5'- CCATTCTATGCGAGGCCCTGTCA -3' (Position: -1629)	5'- GCGTGATGGGCCCCGGGCCAC -3' (Position: -438)	1192	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 57,8°C, Amplifikation: 180 s, 72°C

cfos-Promotor I	5' - CATATTAGGACATCTGCGTC - 3' (Position: -468)	5' - CTGCGCGTTGACAGGCGAGCC -3' (Position: +141)	609	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 56°C, Amplifikation: 90 s, 72°C
cfos-Promotor II	5' - CACCCCCTTCAAATGTCTTC - 3' (Position: -1109)	5' - GGTTTCGGGGATGGCT -3' (Position: -395)	715	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 45,5°C, Amplifikation: 90 s, 72°C
cfos-Promotor III	5' - AGCCCCGTGTTCCAGGACGTG - 3' (Position: -1410)	5' - AGACCTTCATCCCCTAACCTC -3' (Position: -830)	581	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 60°C, Amplifikation: 90 s, 72°C
cfos-Promotor IV	5' - GTTCCACGAATCCCCGCCTC - 3' (Position: -2008)	5' - AGGGTGGAGGACGGGGGCTG -3' (Position: -1305)	704	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 65°C, Amplifikation: 90 s, 72°C
junB (codierende Region)	5' - ATGTGCACTAAAATGGAACAG - 3' (Position: +1)	5' - CAGGGGACGTTCAGAAGGCGTGT -3' (Position: +1054)	1054	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 52°C, Amplifikation: 180 s, 72°C
junD (codierende Region)	5' - ATGGAAACACCCTTCTACGGC - 3' (Position: +1)	5' - CGGACTCAGTACGCGGGCACCTG -3' (Position: +1049)	1049	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 60°C, Amplifikation: 180 s, 72°C

Die Positionsangaben beziehen sich auf die erste Base des Primers.

Bindungsstelle für die T7-RNA-Polymerase (5'-Ende): 5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'
 Bindungsstelle für die *Eco* RI-Restriktionsendonuklease: 5' - GAATTC - 3'
 Bindungsstelle für die *Bam* HI-Restriktionsendonuklease: 5' - GGATCC - 3'

Tabelle A3: Primersequenzen und sequenzspezifische PCR-Bedingungen für die Synthese der Fragmente zur Klonierung der Promotorabschnitte in den Vektor pUBT-luc.

Primeraufbau:

Primer upstream: *Not* I-Schnittstelle + Primer-Bindungsstelle
 Primer downstream: *Hind* III-Schnittstelle + Primer-Bindungsstelle

DNA-Abschnitt	Primer upstream (5'→3')	Primer downstream (3'→5')	Produkt (in bp)	Amplifikationsprotokoll (45 Zyklen)
cjun-Promotor I	5'- AGAGCCTTGTCTCCAGCCGGCCCC - 3' (Position: -779)	5'- AGAACAGTCCGTCAC TTCAC - 3' (Position: -1)	779	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 58°C, Amplifikation: 180 s, 72°C
cjun-Promotor II	5'- ACCGTCGCTCCTGAA - 3' (Position: -1736)	5'- GCCACTTGTCTCCGGGT - 3' (Position: -619)	1118	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 50°C, Amplifikation: 180 s, 72°C
junB-Promotor I	5'- TCCTCCGTCCTGTGAAAATTCCAG - 3' (Position: -842)	5'- CCGGGCGGCCAGGCGGTCTG - 3' (Position: -1)	842	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 56°C, Amplifikation: 180 s, 72°C
cfos-Promotor I	5'- CATATTAGGACATCTGCGTC - 3' (Position: -468)	5'- CGTGGCGGTTAGGCAAAGCCG - 3' (Position: -1)	468	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 50°C, Amplifikation: 90 s, 72°C

Die Positionsangaben beziehen sich auf die erste Base des Primers.

Im Falle der direkt vor dem Startcodon liegenden Promotorschnitte wurden andere Primer als für die NIRCA-Fragmentsynthese gewählt, da diese Primer ebenfalls ein Stück der codierenden Sequenz der jun-/fos-Gene amplifiziert hätten. Dies wurde vermieden, um Störungen der Luziferase-Expression (z. B. durch eine Verschiebung des Leserasters der Luziferase) vorzubeugen.

Bindungsstelle für die *Not* I-Restriktionsendonuklease: 5' - GCGGCCGC - 3'
 Bindungsstelle für die *Hind* III-Restriktionsendonuklease: 5' - AAGCTT - 3'

Tabelle A4: Primersequenzen und sequenzspezifische PCR-Bedingungen für die (asymmetrische) Synthese der ArrayTube-Fragmente.

DNA-Abschnitt	Primer upstream (5'→3')	Primer downstream (3'→5')	Produkt (in bp)	Amplifikationsprotokoll (45 Zyklen)
cjun-Promotor I	5'- AGAGCCTGGTCTCCAGCCGCCCC - 3' (Position: -779)	5'- TGCCCGTTGCTGGACTGGATTATC -3' (Position: +260)	1039	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 60°C, Amplifikation: 180 s, 72°C
cjun-Promotor II	5'- ACCGTCGCTCCTGAA -3' (Position: -1736)	5'- GCCACTTGTCTCCGGGT -3' (Position: -619)	1118	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 50°C, Amplifikation: 180 s, 72°C
junB-Promotor I	5'- TCCTCCGTCCTGTGAAAATTCCAG -3' (Position: -842)	5'-CGCTTTGAGACTCCGGTAGGGGTC-3' (Position: +156)	1050	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 53°C, Amplifikation: 180 s, 72°C
cfos-Promotor I	5'- CATATTAGGACATCTGCGTC - 3' (Position: -468)	5'- CTGCGCGTTGACAGGCGAGCC -3' (Position: +141)	609	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 56°C, Amplifikation: 90 s, 72°C
cjun (codierende Region)	5'- CGTGAAGTGACGGACTGTTCT - 3' (Position: -21)	5'- TCTTCAAAATGTTTGCAACTG - 3' (Position: +999)	1020	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 52°C, Amplifikation: 180 s, 72°C
cfos (codierende Region)	5'- ATGATGTTCTCGGGCTTCAA - 3' (Position: +1)	5'- GGTGCGACGACCGGGGACACT - 3' (Position: +2501)	2501	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 52°C, Amplifikation: 180 s, 72°C

Die Positionsangaben beziehen sich auf die erste Base des Primers.

Tabelle A5: Primersequenzen und genspezifische PCR-Bedingungen für die Synthese der Fragmente zur Klonierung der externen Standards (für die „real-time“ PCR).

Primeraufbau:

Primer upstream: *Eco* RI-Schnittstelle + Primer-Bindungsstelle

Primer downstream: *Bam* HI-Schnittstelle + Primer-Bindungsstelle

DNA-Abschnitt	Primer upstream (5'→3')	Primer downstream (3'→5')	Produkt (in bp)	Amplifikationsprotokoll (40 Zyklen)
gapdh	5'- CGGAGTCAACGGATTTGG - 3' (Position: +18)	5'- AGCCTTCTCCATGGTGGTG -3' (Position: +324)	307	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 52°C, Amplifikation: 120 s, 72°C
cjun	5'- CGTGAAGTGACGGACTGTTC -3' (Position: -21)	5'- TCTTCAAAAATGTTTGCAACTG -3' (Position: +1017)	1038	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 52°C, Amplifikation: 180 s, 72°C
junB	5'- ATGTGCACATAAAATGGAACAG -3' (Position: +1)	5'- GGGGACGTTTCAGAAGGCGTGT -3' (Position: +1052)	1052	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 56°C, Amplifikation: 180 s, 72°C
cfos*	5' - ATGATGTTCTCGGGCTTCAA - 3' (Position: +1)	5'- GGTGCGACGACCGGGGACACT -3' (Position: +2501)	1143	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 52°C, Amplifikation: 180 s, 72°C

auf-1	5' - ATGTCGGAGGAGCAGTTCGG - 3' (Position: +1)	5' - TCCTCGTTCTTACTGGCGTC -3' (Position: +224)	224	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 63°C, Amplifikation: 120 s, 72°C,
ttp	5' - AGCCTCCTGTCGCTGAGCCC - 3' (Position: +839)	5'- AGGTCCGACATAGCTCAGTC -3' (Position: +1148)	310	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 63°C, Amplifikation: 120 s, 72°C,
huR	5' - ATGTCTAATGGTTATGAAGAC - 3' (Position: +1)	5'- GCTACTTTATCCCGAATAAG -3' (Position: +170)	170	Denaturierung: 45 s, 95°C, Primer annealing: 45 s, 53°C, Amplifikation: 120 s, 72°C,

*amplifiziert aus der cDNA; ergibt durch den Wegfall der Introns ein kürzeres Produkt bei Amplifikation aus genomischer DNA.

Die Positionsangaben beziehen sich auf die erste Base des Primers.

Bindungsstelle für die *Eco* RI-Restriktionsendonuklease: 5' - GAATTC - 3'

Bindungsstelle für die *Bam* HI-Restriktionsendonuklease: 5' - GGATCC - 3'

Tabelle A6: Primersequenzen und genspezifische „real-time“ PCR-Bedingungen.

Gen	Primer upstream (5'→3')	Primer downstream (3'→5')	Produkt (in bp)	Amplifikationsprotokoll (50 Zyklen)	Aufnahme der Schmelzkurve (1 Zyklus)
gapdh	5'- CGGAGTCAACGGATTTGG - 3' (Position: +18)	5'- AGCCTTCTCCATGGTGGTG - 3' (Position: +324)	307	Denaturierung: 5 s, 95°C, Primer annealing: 10 s, 53°C, Amplifikation: 20 s, 72°C, zusätzlicher Heizschritt*: 5 s, 77°C	Abkühlen: 15 s, 58°C
cjun	5'- GCAACTTCAACCCAGGCGCGCTGA - 3' (Position: +521)	5'- TCTTCAAAATGTTTGCAACTG - 3' (Position: +996)	476	Denaturierung: 15 s, 95°C, Primer annealing: 10 s, 55°C, Amplifikation: 30 s, 72°C, zusätzlicher Heizschritt*: 5 s, 82°C	Abkühlen: 15 s, 60°C
junB	5'- GAGCTCGTACCCGACGACCAC - 3' (Position: +615)	5'- TTCCGCAGCCGCTTGCGCTCCAC - 3' (Position: +833)	219	Denaturierung: 15 s, 95°C, Primer annealing: 10 s, 60°C, Amplifikation: 13 s, 72°C, zusätzlicher Heizschritt*: 5 s, 87°C	Abkühlen: 15 s, 72°C
junD	5'- GCCGCCTCCAAGTGCCGCAAG - 3' (Position: +841)	5'- CGGACTCAGTACGCGGGCACCTG - 3' (Position: +1048)	208	Denaturierung: 10 s, 95°C, Primer annealing: 10 s, 63°C, Amplifikation: 15 s, 72°C, zusätzlicher Heizschritt*: 5 s, 85°C	Abkühlen: 15 s, 68°C
cfos	5'- AGACATGGACCTATCTGGGTCCT - 3' (Position: +2228)	5'- TGTAATGCACCAGCTCGGGCAGTG - 3' (Position: +2563)	336	Denaturierung: 5 s, 95°C, Primer annealing: 10 s, 58°C, Amplifikation: 25 s, 72°C, zusätzlicher Heizschritt*: 5 s, 83°C	Abkühlen: 15 s, 68°C

auf-1	5'- ATGTCGGAGGAGCAGTTCGG -3' (Position: +1)	5'- TCCTCGTTCTTACTGGCGTC -3' (Position: +224)	224	Denaturierung: 5 s, 95°C, Primer annealing: 10 s, 63°C, Amplifikation: 15 s, 72°C, zusätzlicher Heizschritt*: 5 s, 73°C	Abkühlen: 15 s, 68°C
ttp	5'- AGCCTCCTGTCGCTGAGCCC -3' (Position: +839)	5'- AGGTCCGACATAGCTCAGTC -3' (Position: +1148)	310	Denaturierung: 5 s, 95°C, Primer annealing: 10 s, 63°C, Amplifikation: 15 s, 72°C, zusätzlicher Heizschritt*: 5 s, 73°C	Abkühlen: 15 s, 68°C
huR	5'- ATGTCTAATGGTTATGAAGAC -3' (Position: +1)	5'- GCTACTTTATCCCGAATAAG -3' (Position: +170)	170	Denaturierung: 5 s, 95°C, Primer annealing: 10 s, 53°C, Amplifikation: 10 s, 72°C, zusätzlicher Heizschritt*: 5 s, 73°C	Abkühlen: 15 s, 58°C

Die Positionsangaben beziehen sich auf die erste Base des Primers.

* zusätzlicher Heizschritt zum Aufschmelzen von Primerdimeren

Tabelle A7: Sequenzen der für das Pyrosequencing eingesetzten Primer.

Für das Pyrosequencing der einzelnen Positionen wurde jeweils entweder ein „upstream“- oder ein „downstream“-Primer eingesetzt.

Sequenzierte Position	Primer upstream (5'→3')	Primer downstream (3'→5')
cjun -1710	5'- CCTGAACTTGACCGAG - 3' (Position: -1727)	
cjun -1676		5'- GCGGTCTCCGAGAGT -3' (Position: -1660)
cjun +604	5'- CCTGGCCTTTCCC - 3' (Position: +587)	
cfos -135	5'- GCATCTGCAGCGAG - 3' (Position: -151)	
cfos -60	5'- CCTACCCAGCTCTGCT- 3' (Position: -76)	

Die Positionsangaben beziehen sich auf die erste Base des Primers.

Tabelle A8: Layout des zur Optimierung der Versuchsbedingungen eingesetzten DNA-Microarrays RHEUMA_1.
Die Definition der Sonden-Nummern ist in Tabelle A10 niedergelegt.

48	46	46	47	47							48
	41	41	42	42	43	43	44	44	45	45	
48	36	36	37	37	38	38	39	39	40	40	48
48	31	31	32	32	33	33	34	34	35	35	48
	26	26	27	27	28	28	29	29	30	30	48
	21	21	22	22	23	23	24	24	25	25	48
	16	16	17	17	18	18	19	19	20	20	48
	11	11	12	12	13	13	14	14	15	15	48
	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	
48	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	48

Tabelle A9: Layout des zur Analyse der Patienten- und Kontrollproben eingesetzten DNA-Microarrays RHEUMA_3
Die Definition der Sonden-Nummern ist in Tabelle A11 niedergelegt.

114	106	107	108	109	110	111	112	113								114
	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	
114	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	114
114	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	114
	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	114
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	114
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	114
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	114
	106	107	108	109	110	111	112	113								
	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	
	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	
	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
114	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	114

Tabelle A10: Definition der Sonden-Spots auf dem DNA-Microarray RHEUMA_1.

Sonden-Nummer	Gen	Position	auftretendes Nukleotid	Wildtyp (wt) / Mutante (M)
1	cfos	+1573	C	M
2	cfos	+1573	T	wt
3	cfos	-1073	A	wt
4	cfos	-1073	C	M
5	cfos	-1106	A	M
6	cfos	-1106	C	wt
7	cfos	-355	A	M
8	cfos	-355	C	wt
9	cjun	-1697	C	M
10	cjun	-1697	G	wt
11	cjun	-1710	C	M
12	cjun	-1710	T	wt
13	cjun	-1968	C	wt
14	cjun	-1968	T	M
15	cfos	+1113/	C	wt
		+1119/	A	wt
		+1125	A	M
16	cfos	+1113/	C	wt
		+1119/	A	wt
		+1125	G	wt
17	cfos	+1113/	C	wt
		+1119/	G	M
		+1125	A	M
18	cfos	+1113/	G	M
		+1119/	A	wt
		+1125	A	wt
19	cfos	-1382	G	M
20	cfos	-1382	T	wt
21	cfos	-239	A	M
22	cfos	-239	C	wt
23	cfos	-392	C	M
24	cfos	-392	T	wt
25	cfos	-647/	A	M
		-650	C	wt
26	cfos	-647/	C	wt
		-650	C	wt
27	cfos	-647/	C	wt
		-650	G	M
28	cjun	+211	A	M
29	cjun	+211	C	wt
30	cjun	+604	CAG	wt
31	cjun	+604	(deletiert)	M
32	cjun	+706	C	wt
33	cjun	+706	T	M
34	cjun	+890	C	wt
35	cjun	+890	T	M
36	cjun	-1194	A	wt

37	cjun	-1194	G	M
38	cjun	-1218	A	M
39	cjun	-1218	G	wt
40	cjun	-1274	A	M
41	cjun	-1274	G	wt
42	cjun	-1351	C	M
43	cjun	-1351	G	wt
44	cjun	-1676	C	M
45	cjun	-1676	G	wt
46	cjun	-1791	A	wt
47	cjun	-1791	G	M
48	Biotin-Spot			

Tabelle A11: Definition der Sonden-Spots auf dem DNA-Microarray RHEUMA_3.

Sonden-Nummer	Gen	Position	auftretendes Nukleotid	Wildtyp (wt) / Mutante (M)
1	cfos	-1382	G	M
2	cfos	-1382	T	wt
3	cfos	-1073	A	wt
4	cfos	-1073	C	M
5	cfos	-1106	A	M
6	cfos	-1106	C	wt
7	cfos	-647/	A	M
		-650	C	wt
8	cfos	-647/	C	wt
		-650	C	wt
9	cfos	-647/	C	wt
		-650	G	M
10	cfos	-392	C	M
11	cfos	-392	T	wt
12	cfos	-355	A	M
13	cfos	-355	C	wt
14	cfos	-239	A	M
15	cfos	-239	C	wt
16	cfos	-135	A	M
17	cfos	-135	T	wt
18	cfos	-135	C	M
19	cfos	-135	T	M
20	cfos	-135	A	wt
21	cfos	-135	C	M
22	cfos	-60	C	wt
23	cfos	-60	T	M
24	cfos	+2145	C	wt
25	cfos	+2145	G	M
26	cfos	+1005	T	M
27	cfos	+1005	C	wt
28	cfos	+1113/	C	wt
		+1119/	A	wt
		+1125	A	M
29	cfos	+1113/	C	wt
		+1119/	A	wt
		+1125	G	wt
30	cfos	+1113/	C	wt
		+1119/	G	M
		+1125	A	M
31	cfos	+1113/	G	M
		+1119/	A	wt
		+1125	A	wt
32	cfos	+1573	C	M
33	cfos	+1573	T	wt
34	cfos	+2280	A	M
35	cfos	+2280	G	wt
36	cfos	+2280	G	M

37	cfos	+2280	A	M
38	cfos	+2280	G	wt
39	cfos	+2280	T	wt
40	cjun	-1968	C	wt
41	cjun	-1968	T	M
42	cjun	-1791	A	wt
43	cjun	-1791	G	M
44	cjun	-1710	C	M
45	cjun	-1710	T	wt
46	cjun	-1697	C	M
47	cjun	-1697	G	wt
48	cjun	-1676	C	M
49	cjun	-1676	G	wt
50	junB	-1524	A	M
51	junB	-1524	G	wt
52	cjun	-1351	C	M
53	cjun	-1351	G	wt
54	cjun	-1274	A	M
55	cjun	-1274	G	wt
56	cjun	-1218	A	M
57	cjun	-1218	G	wt
58	cjun	-1194	A	wt
59	cjun	-1194	G	M
60	cjun	-945	A	M
61	cjun	-945	C	wt
62	cjun	-823	A	wt
63	cjun	-823	deletiert	M
64	cjun	-826	C	wt
65	cjun	-826	T	M
66	cjun	-703	G	wt
67	cjun	-703	T	M
68	cjun	-605	C	wt
69	cjun	-605	G	M
70	cjun	-526	C	M
71	cjun	-526	G	wt
72	cjun	-526	T	M
73	cjun	-526	G	wt
74	cjun	-526	C	M
75	cjun	-526	T	M
76	junB	-484	C	wt
77	junB	-484	G	M
78	cjun	-289	A	wt
79	cjun	-289	C	M
80	cjun	-174	G	wt
81	cjun	-174	T	M
82	cjun	-71	C	wt
83	cjun	-71	G	M
84	cjun	-64	A	M
85	cjun	-64	G	wt

86	cjun	-32	A	wt
87	cjun	-32	G	M
88	cjun	+211	A	M
89	cjun	+211	C	wt
90	junB	+474	A	M
91	junB	+474	C	wt
92	cjun	+522	C	wt
93	cjun	+522	T	M
94	cjun	+604	CAG	wt
95	cjun	+604	(deletiert)	M
96	cjun	+706	C	wt
97	cjun	+706	T	M
98	cjun	+750	A	M
99	cjun	+750	G	wt
100	cjun	+890	C	wt
101	cjun	+890	T	M
102	TNFRII	+25807	G	M
103	TNFRII	+25807	T	wt
104	TNFRII	+25807	A	M
105	TNFRII	+25807	G	M
106	TNFRII	+25807	A	M
107	TNFRII	+25807	T	wt
108	p53	+1395	A	wt
109	p53	+1395	G	M
110	p53	+1396	T	M
111	p53	+1396	C	wt
112	TNF	-418	A	M
113	TNF	-418	G	wt
114	Biotin-Spot			

Tabelle A12: Ablauf der einzelnen Versuchsschritte eines AT-Versuches.

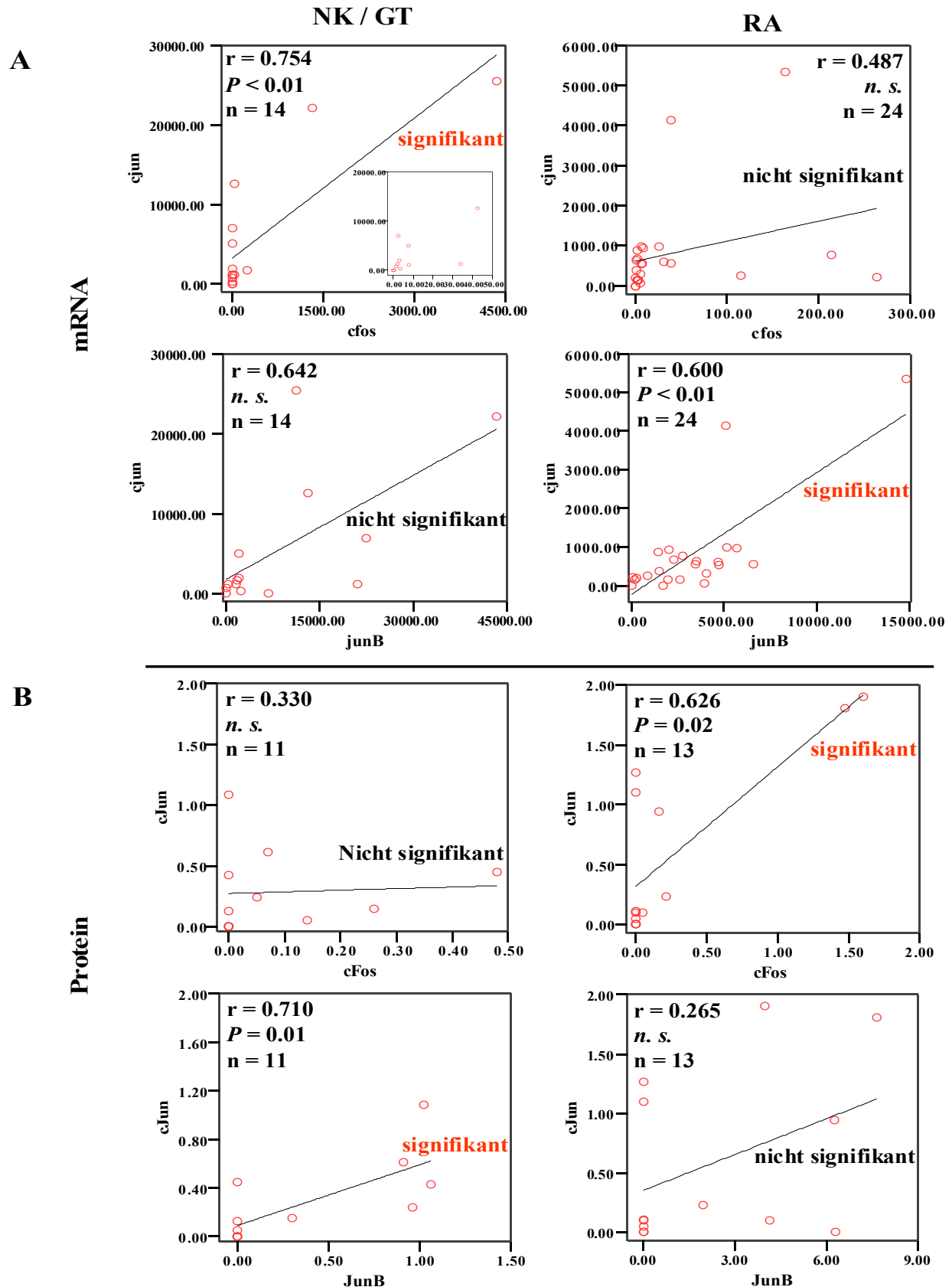
Versuchsschritt	Volumen	Zeit	Temperatur	Schütteln
Prä-Inkubation des AT (2x) mit Hybridisierungspuffer	500 µl	5 min	30°C	550 rpm
Denaturierung der Hybridisierungslösung (10 – 20 µl biotinyliertes Template in Hybridisierungspuffer)	100 µl	5 min	95°C	-
Abkühlung der Hybridisierungslösung	-	2 min	RT	-
Hybridisierung	100 µl	16 h	template- abhängig	400 rpm
1. Waschen: 2 x SSC/0,2% SDS	500 µl	5 min	30°C	550 rpm
2. Waschen: 2 x SSC	500 µl	5 min	20°C	550 rpm
3. Waschen: 0,2 x SSC	500 µl	5 min	20°C	550 rpm
Blockierung mit 10% FCS in 6 x SSPE/0,005% Triton	100 µl	10 min	30°C	550 rpm
Markierung mit HRP-Streptavidin (1:10.000) in 6 x SSPE/0,005% Triton	100 µl	20 min	30°C	550 rpm
1. Waschen: 2 x SSC/0,01% Triton	500 µl	5 min	20°C	550 rpm
2. Waschen: 2 x SSC	500 µl	5 min	20°C	550 rpm
3. Waschen: 0,2 x SSC	500 µl	5 min	20°C	550 rpm
Enzymreaktion nach Zugabe Von True Blue HRP-Substrat	100 µl	-	-	-
Auswertung im AT-Reader	-	template- abhängig	25°C	-

Tabelle A13: Parametervariationen bei der Optimierung der AT-Versuch.

Parameter	Durchgeführte Variationen
Probenkonzentration	<i>abhängig vom Fragment und der Fragmentsynthese</i>
Hybridisierungspuffer	SSPE, 3DNA
Hybridisierungsdauer	2h, 5h, 8h, 16h
Hybridisierungstemperatur	40°C, 45°C, 50°C, 53°C, 55°C, 60°C
Stärke des Schüttelns	400 rpm, 450 rpm, 500 rpm, 550 rpm
Waschpuffer	2 x SSC + 0,2% SDS, 2 x SSC + 0,01% Triton
Zusammensetzung der Blockierungslösung	Milchpulver, FCS; gelöst in 6 x SSPE + 0,1% SDS oder 6 x SSPE + 0,005% Triton
Konzentration der Blockierungslösung	5% , 10%, 20%
Inkubationszeit der Blockierung	10 min, 15 min, 20 min, 30 min
Zusammensetzung der Markierungslösung	HRP-Streptavidin; 1:100 vorverdünnt in PBS, SSPE, 3DNA; verdünnt in SSPE, 3DNA
Konzentration der Markierungslösung	1:5000, 1:10000
Inkubationszeit der Markierung	10 min, 15 min, 20 min, 30 min

Anhang B: Anhang zu den Ergebnissen

Abbildung B1: Spearman-Rank Korrelationsanalyse der (A) mRNA- und der (B) Proteinexpression der jun- und fos-proto-Onkogene in der Synovialmembran von NK/GT (mRNA: n = 14; Protein: n = 11) und RA-Patienten (mRNA: n = 24; Protein: n = 13).



Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein herzlicher Dank gilt zunächst Herrn Professor Dr. R. W. Kinne für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung sowie Herrn Professor Dr. R. Wetzker für die Betreuung der Arbeit an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät und Herrn Professor Dr. S. Wölfl für seine Bereitschaft, als externer Gutachter dieser Arbeit zu fungieren.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Experimentelle Rheumatologie für die unschätzbare Hilfe sowie für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin bin ich den Mitarbeitern des Institutes für Virologie der FSU Jena zu Dank verpflichtet, namentlich Herrn Professor Dr. A. Stelzner, Frau Dr. B. Glück und Frau Dr. R. Egerer für die Möglichkeit, den LightCycler zu nutzen sowie Herrn Dr. Birch-Hirschfeld für die Synthese der Primer.

Ich danke Herrn Dr. Y. Shaul, für die freundliche Überlassung des Plasmids „RSV-JunD“ und Herrn Professor Dr. W. F. C. Rigby, der freundlicherweise den Anti-HuR-Antikörper zur Verfügung stellte.

Bei Frau Dr. U. Gausmann und Herrn Dr. K. Szafranski bedanke ich mich für die Durchführung der Konservierungsanalyse der jun- und fos-Gene. Herrn Dr. M. Utting und Frau B. Fischer bin ich für die gute Zusammenarbeit beim Pyrosequencing zu Dank verpflichtet. Herrn Dr. B. Stuhlmüller danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der mRNA-Qualitätsanalysen.

Bei Herrn Dr. D. Pohlers, Herrn Dr. M. Förster und Herrn Dr. M. Augsten möchte ich mich für ihre hilfreichen Tips bezüglich des erfolgreichen Verfassens von Dissertationen bedanken.

Für die ideelle und finanzielle Förderung während meines Studiums und bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanke ich mich bei der Studienstiftung des Deutschen Volkes, insbesondere bei Herrn Dr. G. Teufel, Herrn M. Frenz und meinem Vertrauensdozenten Herrn Prof. Dr. G. Willems.

Nicht zuletzt möchte ich mich besonders herzlich bei meinen Eltern und meinen Freunden bedanken, auf deren bedingungslose Unterstützung ich mich stets verlassen konnte.

Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang

René Huber

04.03.1976	Geboren in Stade/Niedersachsen Staatsangehörigkeit: Deutsch
1982-1986	Besuch der Grundschule Stade-Hahle
1986-1988	Besuch der Orientierungsstufe Stade-Hohenwedel
1988-1995	Besuch des Vincent-Lübeck-Gymnasiums in Stade Abschluß: Abitur
1995-1996	Ableistung des Grundwehrdienstes
1996-2001	Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Studienfach: Biochemie/Molekularbiologie; von 1999-2001 Förderung durch die Studienstiftung des deutschen Volkes
1999-2000	Wissenschaftliches Praktikum in der Nachwuchsgruppe Experimentelle Rheumatologie am Klinikum der FSU Jena bei PD Dr. R. W. Kinne
2000-2001	Ablegung der Diplomprüfung Prüfungsfächer: Biochemie, Molekularbiologie, Zellbiologie, Biochemische Pharmakologie Anfertigung der Diplomarbeit in der Nachwuchsgruppe Experimentelle Rheumatologie am Klinikum der FSU Jena bei PD Dr. R. W. Kinne. Thema: „Analyse der Expression und Detektion von potentiellen Mutationen des Proto-Onkogens junD in der Synovialmembran von Patienten mit chronischer Polyarthritis“
Nov. 2001-Juni 2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter (BATII/2) in der NWG Experimentelle Rheumatologie im Rahmen des Jenaer Centrums für Bioinformatik
Seit April 2002	Doktorand in der AG Experimentelle Rheumatologie

Juni 2002-Mai 2003	Projektleiter des IZKF-Nachwuchsförderprojektes N6: „Die Bedeutung von Jun- und Fos-Proto-Onkogenen in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis: Analyse der Genexpression und Detektion von Punktmutationen“
Juli 2002 bis Juni 2005	Promotionsstipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes

Jena, den 15.12.2005

René Huber

Publikationsverzeichnis

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen:

Elke Kunisch, Dirk Pohlers, Sandra Dunger, René Huber, Annett Kreusch, Bernd Wiederanders, Raimund W. Kinne; What can experimental research offer to rheumatology today - the viewpoint of molecular biology? Contribution of molecular biology to pathogenesis research in rheumatology using the example of rheumatoid arthritis; *Z Rheumatol*, 61, Suppl 2:II1-II5, 2002

René Huber, Elke Kunisch, Brigitte Glück, Renate Egerer, Stefan Sickinger, Raimund W. Kinne; Comparison of conventional and real-time RT-PCR for the quantitation of jun proto-oncogene mRNA and analysis of junB mRNA expression in synovial membranes and isolated synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients; *Z Rheumatol*, 62, 378-389, 2003

René Huber, Bruno Stuhlmüller, Elke Kunisch, Raimund W. Kinne; Discrepancy between *jun/fos* proto-oncogene mRNA and protein expression in the rheumatoid arthritis synovial membrane; *Ann Rheum Dis* (**eingereicht**)

Weitere Originalpublikationen

Dirk Pohlers, René Huber, Bärbel Ukena, Raimund W. Kinne; Expression of PDGF-C and PDGF-D in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis; *Arthritis & Rheumatism*, 2005 (in Druck)

Vorträge (national)

René Huber, Elke Kunisch, Brigitte Glück, Renate Egerer, Stefan Sickinger, Axel Stelzner, Raimund W. Kinne; Anwendung und Optimierung der real-time RT-PCR zur Quantifizierung der mRNA-Expression von Proto-Onkogenen; Seminar LightCycler-Technologie, Juni 19, 2001, Leipzig

René Huber, Sandra Dunger, Raimund W. Kinne; Detection of mutations in the promoters of the AP-1 subunits *cjun*, *junB*, *junD*, and *cfos* in rheumatoid arthritis synovial tissue; JCB-Workshop 2002, November 16, 2002, Jena

René Huber, Sandra Dunger, Raimund W. Kinne; Detection of mutations/SNPs in the promoters of proto-oncogenes in rheumatoid arthritis synovial tissue; JCB-Workshop 2003, Dezember 05, 2003, Jena
(3. Preis für Präsentation)

René Huber, Michael Utting, Anke Wöstemeyer, Ralf Ehrlich, Bärbel Ukena, Hansjörg Thude, Thorsten Eidner, Gert Hein, Raimund W. Kinne; Multiple detection methods for mutations/SNPs in the promoters of proto-oncogenes in rheumatoid arthritis synovial tissue; JCB-Workshop 2004, Dezember 03, 2004, Jena

René Huber, Michael Utting, Anke Wöstemeyer, Ralf Ehricht, Bärbel Ukena, Hansjörg Thude, Thorsten Eidner, Gert Hein, Raimund W. Kinne; Entwicklung eines DNA-Microarrays zur Untersuchung von SNPs/Mutationen - Assoziationsstudien mit rheumatischen Erkrankungen; Seminar Transfusionsmedizin, Februar 15, 2005, Jena

Kurzfassungen (national)

Sandra Dunger, René Huber, Bärbel Ukena, Stefan Sickinger, Raimund W. Kinne; Untersuchungen zur Rolle des AP-1 Komplexes in der rheumatoiden Arthritis (RA); 30. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, September 19-22, 2001, Leipzig (1. Preis für Posterpräsentation)

René Huber, Elke Kunisch, Bärbel Ukena, Raimund W. Kinne; Analysis of *jun* and *fos* proto-oncogene mRNA expression in the rheumatoid arthritis synovial membrane; 32. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, September 03-06, 2003, Frankfurt am Main

René Huber, Bruno Stuhlmüller, Elke Kunisch, Raimund W. Kinne; Analysis of *jun* and *fos* proto-oncogene mRNA and protein expression in the rheumatoid arthritis synovial membrane; Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Bindegewebforschung, März 11-13, 2004, Jena

René Huber, Michael Utting, Anke Wöstemeyer, Ralf Ehricht, Bärbel Ukena, Hansjörg Thude, Thorsten Eidner, Gert Hein, Raimund W. Kinne; Development of a DNA-Microarray - a new detection method for mutations/SNPs in the promoters of proto-oncogenes; Evaluierung Bioinformatik-Centren, Februar 23-24, 2005, Berlin

René Huber, Bruno Stuhlmüller, Elke Kunisch, Raimund W. Kinne; Discrepancy between *jun/fos* proto-oncogene mRNA and protein expression in the rheumatoid arthritis synovial membrane; 34. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, September 14-17, 2005, Dresden

Dirk Pohlers, René Huber, Bianca Lanick, Bärbel Ukena, Raimund W. Kinne; Expression of PDGF-C and -D in the synovial membrane of rheumatoid arthritis and osteoarthritis; 34. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, September 14-17, 2005, Dresden

Kurzfassungen (international)

René Huber, Bruno Stuhlmüller, Elke Kunisch, Raimund W. Kinne; Discrepancy between *jun/fos* proto-oncogene mRNA and protein expression in the rheumatoid arthritis synovial membrane; 25. Kongress des European Workshop for Rheumatology Research, Februar 24-27, 2005, Glasgow, Großbritannien

Jena, den 15.12.2005

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne Inanspruchnahme unerlaubter fremder Hilfe angefertigt habe. Ich habe nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen zur Anfertigung dieser Arbeit eingesetzt und alle Materialien oder Dienstleistungen, die ich von Dritten erhalten habe, als solche gekennzeichnet.

Jena, den 15.12.2005

René Huber

Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, daß ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Doctor rerum naturalium beworben habe und daß ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung des Verfahrens zum Erwerb des o.g. Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena ist mir bekannt.

Jena, den 15.12.2005

René Huber